Н. С. ДРОЗДОВ

ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО ПО БИОХИМИИ МЯСА

Mu

Проф. Н. С. ДРОЗДОВ
Доктор химических наук

ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО ПО БИОХИМИИ МЯСА

Допущено
Министерством высшего образования СССР
в качестве учебного пособия
по общей и специальной биохимии
для технологов по переработке
животного сырья

ПИЩЕПРОМИЗДАТ — МОСКВА
1950

н
м
ск
ст
ве
пр
ств
и,
есте
свое
ден
под

риа
бот
бол
студ
ческ
1) э
реа
4) у
К
стоя
круп
не з
ческо
ние
лабор
лам и

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОБЩАЯ ЧАСТЬ

Глава I

ЭЛЕМЕНТАРНЫЙ И ОБЩИЙ ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ОРГАНИЗМА

Работа 1. Определение содержания воды и сухого остатка в крови . . . 9
Работа 2. Определение содержания воды и сухого остатка в мышечной ткани 9
Работа 3. Качественное открытие важнейших элементов, входящих в состав ткани 9
Работа 4. Качественное исследование состава кости 12
Работа 5. Качественное открытие иода в ткани щитовидной железы . . 12
Работа 6. Качественное открытие роданистых солей в слюне человека . . 13
Работа 7. Определение кальция в мышечной ткани по Ретинскому . . . 13
Работа 8. Определение кальция и магния в сыворотке крови 14
Работа 9. Определение неорганического, органического и общего фосфора в сыворотке крови 17
Работа 10. Определение хлора в мышечной ткани или крови 19
Работа 11. Определение хлора в крови по Рушняку 19
Работа 12. Определение общего азота мышечной ткани или крови по Кьельдалю 20

Глава II

АКТИВНАЯ РЕАКЦИЯ СРЕДЫ И БУФЕРНЫЕ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМА

Работа 13. Колориметрическое определение концентрации водородных ионов безбуферным методом 26
Работа 14. Колориметрическое определение концентрации водородных ионов окрашенной жидкости 28
Работа 15. Приготовление и изучение свойств буферных смесей 29
Работа 16. Колориметрическое определение концентрации водородных ионов с помощью буферных смесей 30
Работа 17. Определение угольной кислоты, связанной в виде бикарбоната в плазме крови 31

Глава III

ФЕРМЕНТЫ

Общая характеристика ферментативных реакций

Работа 18. Специфичность ферментативного действия 40
Работа 19. Термолабильность ферментов и влияние [H·] на ферментативные реакции 40
Работа 20. Влияние температуры на скорость ферментативной реакции . 41
Работа 21. Зависимость скорости ферментативной реакции от количества фермента 41
Работа 22. Определение [H·] оптимальной для амилокластической активности амилазы слюны 42
Работа 23. Влияние хлористого натрия и фенилтиомочевины (активаторов) на амилокластическую активность амилазы слюны 43

Отдельные представители ферментов и получение ферментных препаратов

Работа 24. Получение препарата сахаразы из дрожжей 45
Работа 25. Получение препарата, содержащего панкреатическую амилазу 46
Работа 26. Гидролитическое расщепление жира при действии панкреатической липазы 47
Работа 27. Кинетика гидролитического расщепления жира под действием липазы 47
Работа 28. Получение препарата уреазы из бобов сои 48
Работа 29. Получение препарата пепсина 49
Работа 30. Трипсин и триптический гидролиз белка 50
Работа 31. Коагулирующее действие химозина и других протеаз 51
Работа 32. Свертывание крови — действие тромбина (фибрин-фермента) 52
Работа 33. Сукциндегидраза мышц 54
Работа 34. Цитохромоксидаза (индофенолоксидаза) 57
Работа 35. Альдегидраза (ксантиноксидаза) молока 59
Работа 36. Фенолоксидазы 61
Работа 37. Пероксидазы 64
Работа 38. Каталаза 66

Количественные определения ферментативного действия и активности ферментов

Работа 39. Определение амилокластической активности амилазы слюны . 69
Работа 40. Определение активности химозина 71
Работа 41. Определение активности тромбина (фибрин-фермента) 72
Работа 42. Определение активности пепсина по Метту 72
Работа 43. Определение активности каталазы по Баху и Зубковой . . . 73

Глава IV
УГЛЕВОДЫ

Работа 44. *d*-(+)-Глюкоза 76
Работа 45. Восстановительная способность глюкозы (реакции восстановления) 78
Работа 46. Определение угла вращения плоскости поляризации и удельного вращения *d*-глюкозы 80
Работа 47. Наблюдение мутаротации с раствором *d*-глюкозы 82
Работа 48. Определение глюкозы по Фелингу 82
Работа 49. Определение глюкозы по Бертрану 83
Работа 50. Определение глюкозы с гипоиодитом 85
Работа 51. *d*-(—)-Фруктоза (левулоза) 88
Работа 52. Реакция Селиванова 88
Работа 53. Цветная реакция с ванилином 89
Работа 54. Мальтоза и лактоза 89
Работа 55. Качественный анализ смеси углеводов методом распределительной хроматографии на фильтровальной бумаге 90
Работа 56. Зависимость редуцирующей способности сахаров от реакции среды и строения молекулы сахара 92
Работа 57. Сахароза 93

Полисахариды

Работа 58. Получение крахмала и растворимый крахмал 95
Работа 59. Реакция крахмала с иодом 95
Работа 60. Промежуточные ступени гидролиза крахмала 96
Работа 61. Гидролиз целлюлозы (клетчатки) 97
Работа 62. Получение гликогена 97

Энзиматический гидролиз углеводов

Работа 63. Определение амилокластической активности (декстринирующего действия) панкреатической амилазы 99
Работа 64. Определение осахаривающего действия панкреатической амилазы 99

Обмен углеводов

Работа 65. Определение сахара крови по Хагедорн-Иенсену 104
Работа 66. Изменение содержания сахара в крови при повышенном всасывании глюкозы в кишечнике 106
Работа 67. Открытие сахара в моче 107
Работа 68. Определение гликогена в печени 109
Работа 69. Определение молочной кислоты в крови 109

Глава V

ЛИПОИДЫ

Жиры

Работа 70. Качественное исследование жира 116
Работа 71. Щелочное омыление жира и получение жирных кислот . . . 117
Работа 72. Определение температуры плавления жира 118
Работа 73. Определение коэфициента преломления жира с рефрактометром Аббе 118
Работа 74. Определение кислотного числа жира 120
Работа 75. Определение числа омыления и эфирного числа жира 120
Работа 76. Определение иодного числа жира 121

Прогоркание жиров

Работа 77. Открытие перекисей в прогоркающем жире 123
Работа 78. Количественное определение перекисей в жире (определение активного кислорода) 124
Работа 79. Открытие эпигидринового альдегида 124
Работа 80. Открытие альдегидов в прогорклом жире 125
Работа 81. Липоксидаза 125
Работа 82. Определение активности липоксидазы 126

Обмен жиров

Работа 83. Открытие ацетоновых тел в моче 130
Работа 84. Количественное определение ацетона в моче 132

Стероиды

Работа 85. Получение холестерина из мозга 136
Работа 86. Цветные реакции на холестерин 136
Работа 87. Открытие холестерина в составе желчи 137
Работа 88. Определение холестерина в крови или сыворотке 137
Работа 89. Свойства и реакции желчных кислот 138

Фосфатиды (фосфолипиды)

Работа 90. Выделение и исследование фосфатидов 142

Глава VI
БЕЛКИ (ПРОТЕИНЫ)

Реакции осаждения

Работа 91. Осаждение при нагревании кислотами и солями тяжелых металлов 150
Работа 92. Осаждение алкалоидными реактивами 150
Работа 93. Осаждение гидратами окисей цинка и меди и каолином . . . 151
Работа 94. Осаждение алкоголем и нейтральными солями щелочных и щелочноземельных металлов (высаливание) 151

Изоэлектрический пункт

Работа 95. Определение изоэлектрического пункта белков методом коагуляции 153

Цветные реакции

Работа 96. Биуретовая реакция (реакция Пиотровского) 154
Работа 97. Нингидриновая реакция. 156
Работа 98. Ксантопротеиновая реакция (реакция на тирозин, триптофан, фенилаланин) 157
Работа 99. Реакция на тирозин (реакция Миллона) 158
Работа 100. Реакция на тирозин с нитрозо-β-нафтолом 158
Работа 101. Реакция на триптофан (реакция конденсации с альдегидами) 159
Работа 102. Реакция с диазобензолсульфокислотой (реакция на тирозин и гистидин) 160
Работа 103. Реакция с бромом на гистидин 161
Работа 104. Реакция на серусодержащие аминокислоты 161
Работа 105. Реакция на метионин 162
Работа 106. Реакция на аргинин 162
Работа 107. Реакция на гликоколл (глицин) 163
Работа 108. Реакция Подобедова 163

Методы количественного исследования аминокислот, полипептидов и белков

Работа 109. Выделение аргинина из белковых гидролизатов 164
Работа 110. Колориметрическое определение триптофана 165
Работа 111. Колориметрическое определение фенилаланина 165
Работа 112. Колориметрическое определение тирозина 166
Работа 113. Формольное титрование 167
Работа 114. Титрование карбоксильных групп аминокислот, полипептидов и белков в водно-алкогольном растворе 168
Работа 115. Газометрическое определение свободных аминогрупп по Ван-Слайку 169

Отдельные представители белковых веществ

Работа 116. Яичный альбумин (овальбумин) 177
Работа 117. Сывороточный альбумин (серумальбумин) 178
Работа 118. Миозин (мышечный глобулин) 179
Работа 119. Коллаген 180
Работа 120. Казеин 180
Работа 121. Нуклеопротеид дрожжей 181
Работа 122. Гемоглобин 184

Продукты гидролитического расщепления белков и ферментативный гидролиз белков и полипептидов

Работа 123. Кислотные и щелочные альбуминаты 194
Работа 124. Альбумозы и пептоны 195
Работа 125. Продукты пептического гидролиза белков 196
Работа 126. Продукты триптического гидролиза белков 196

Работа 127. Действие комплекса ферментов эрепсина 197
Работа 128. Определение активности пептического действия 197
Работа 129. Определение пептической активности по расщеплению глобина крови 198
Работа 130. Определение пептической активности по расщеплению белков сыворотки крови 198
Работа 131. Определение триптического действия с помощью формольного титрования 199
Работа 132. Определение активности триптического действия 200
Работа 133. Действие дипептидазы слизистой тонких кишок или ткани почек 200

Исследование различных фракций азотистых веществ тканей

Работа 134. Определение общего азота сыворотки крови 204
Работа 135. Определение белкового азота и белка сыворотки крови . . 205
Работа 136. Рефрактометрическое определение белков сыворотки крови 206
Работа 137. Определение небелкового (остаточного) азота в сыворотке крови по Культюгину 207
Работа 138. Определение небелкового (остаточного) азота в сыворотке крови по Энгельгардту и Любимовой 209
Работа 139. Определение азота мочевины в крови уреазным методом . . . 210

Обмен белков и конечные продукты азотистого обмена

Работа 140. Определение общего азота мочи по Кьельдалю 220
Работа 141. Определение общего азота мочи по Иохельсону 220
Работа 142. Получение мочевины из мочи. 221
Работа 143. Количественное определение мочевины в моче по Бородину . 222
Работа 144. Количественное определение азота аммиака в моче 223
Работа 145. Колориметрическое определение азота аммиака в моче по Сергееву 225
Работа 146. Открытие креатинина в моче 225
Работа 147. Количественное определение креатинина в моче 227
Работа 148. Количественное определение креатина в моче 228
Работа 149. Качественное открытие мочевой кислоты в моче 228
Работа 150. Исследование некоторых свойств мочевой кислоты . . . 229
Работа 151. Осаждение мочевой кислоты в виде кислого мочекислого аммония 230
Работа 152. Определение мочевой кислоты в моче 230
Работа 153. Определение гиппуровой кислоты в моче 231
Работа 154. Открытие индикана в моче 232

Глава VII

ВИТАМИНЫ

Группа витамина А

Работа 155. Цветные реакции на витамин А 237
Работа 156. Определение суммы каротиноидов в сыворотке крови по Рачевскому 237

Группа витамина D

Работа 157. Цветные реакции на витамин D 239

Группа витамина Е

Работа 158. Открытие витамина Е 241
Работа 159. Количественное определение витамина Е по Захаровой и Девятнину 241

Группа витамина К

Работа 160. Цветные реакции на витамин К 243

Витамин С (*l*-аскорбиновая кислота)

Работа 161. Качественное открытие витамина С 246
Работа 162. Количественное определение аскорбиновой кислоты 246

СПЕЦИАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава VIII

ХИМИЯ МЯСА

Работа 163. Качественное исследование химического состава мышцы . . 255
Работа 164. Определение общего, белкового и остаточного азота и азота белков, извлекаемых водой 257
Работа 165. Определение различных фракций белкового азота мяса по Миндлиной и Пальмину 259
Работа 166. Определение коллагена и эластина в мясе по Воловинской . 2 0
Работа 167. Определение миозина (актомиозина) по Соловьеву 262
Работа 168 Получение миозина 262
Работа 169. Определение изоэлектрического пункта цельной мышцы и ее водного экстракта 263
Работа 170. Фракционирование белков водного экстракта мышцы . . . 264
Работа 171. Определение карнозина по Паршину 265
Работа 172. Определение азота аммиака (азота аммонийных солей) в мышце 265
Работа 173. Определение гликогена в мышце 266
Работа 174. Определение гликогена и редуцирующего сахара по Воловинской и Широкову 267
Работа 175. Определение общего и неорганического фосфора в мясе по Ширскову 269
Работа 176. Определение аскорбиновой кислоты в мясе 273
Работа 177. Определение жира в мясе 273
Работа 178. Определение иодного числа жира 273
Работа 179. Определение кислотности жира и проба на появление кислотности с нейтральной красной 274
Работа 180. Качественное определение перекисей в жире по Кульбергу и Сойферу 275
Работа 181. Наблюдение над окислением жира при действии липоксидазы 275

Приготовление некоторых реактивов и препаратов 277

ПРЕДИСЛОВИЕ

„Истинный химик должен быть теоретиком и практиком"

М. В. Ломоносов.

Настоящее руководство к практическим лабораторным занятиям составлено по программе курса общей биохимии и химии мяса для студентов технологов Московского химико-технологического института мясной промышленности, утвержденной Министерством Высшего Образования 1 июля 1949 г. В полном соответствии с этой программой и с содержанием рекомендуемого программой курса практических занятий в настоящее руководство входят, с одной стороны, работы по общему курсу биохимии и, с другой — по специальному разделу химии мяса. При этом, естественно, работы, касающиеся общего раздела, подчинены по своему характеру и материалу, предлагаемому вниманию студента, специфическим задачам курса биохимии в учебном плане подготовки инженера-технолога мясной промышленности.

Общее расположение и последовательность изложения материала руководства подчинены требованиям, вытекающим из работы студента над лекционным курсом. Для того, чтобы возможно более тесным образом связать практические работы, выполняемые студентом в лаборатории, с вопросами лекционного курса, практические работы объединены в следующих восьми основных разделах: 1) элементарный и общий химический состав организма, 2) активная реакция среды и буферные системы организма, 3) ферменты, 4) углеводы, 5) липоиды, 6) белки, 7) витамины и 8) химия мяса.

Кроме того, чтобы ближе связать теоретический курс с самостоятельной работой студента у лабораторного стола, по всем крупным разделам даны краткие общие вступления, которые, не заменяя более подробного изложения вопроса в теоретическом курсе, должны помочь студенту фиксировать свое внимание на тех вопросах, с которыми связана выполняемая им лабораторная работа. Краткие пояснения по более мелким разделам и общие вступления к описанию отдельных работ, преследуя

ту же цель, должны, кроме того, помочь студенту критически оценить значение получаемых им результатов.

Кроме работ, обязательных как минимум для всех студентов, отрабатывающих практические занятия, в руководство введено определенное число задач, которые могут быть использованы при работе студентами-отличниками.

В руководство включены лишь такие работы, возможность успешного выполнения которых в условиях студенческих занятий неоднократно проверена практически. При этом возможно полно отражены методы, разработанные нашими советскими исследователями.

Готовые формулы для расчета анализов почти везде сознательно опущены, так как они побуждают обычно к чисто механическому решению задачи.

Н. Дроздов

Москва 3/IV—50 г.

ОБЩАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА I

ЭЛЕМЕНТАРНЫЙ И ОБЩИЙ ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ОРГАНИЗМА

«Организм без внешней среды, поддерживающей его существование, невозможен, поэтому в научное определение организма должна входить и среда, влияющая на него».

И. М. Сеченов.

«Живые организмы не являются случайным фактом в химической организованности земной коры; они образуют её наиболее существенную и неотделимую часть. Они неразрывно связаны с косной материей земной коры, с минералами и с горными породами. Реальный организм неразрывно связан с окружающей средой... Нельзя изучать и понять организм, нельзя познать его форму и жизнедеятельность, не изучая и не зная среду жизни».

В. И. Вернадский.

«Организм и необходимые для его жизни условия представляют единство».

Т. Д. Лысенко.

Живые организмы, обитая в окружающей их среде, вступают с нею в теснейшую связь. Эта связь выражается прежде всего в непрерывном в течение жизни всякого организма процессе питания, причем организм захватывает из окружающей среды вещества, за счет которых и происходит дальнейшее построение химических соединений, входящих в его состав. Автотрофами такой синтез осуществляется непосредственно и исключительно за счет неорганических веществ окружающей их среды и использования энергии солнечного света (фотосинтез) или энергии отдельных химических процессов (хемосинтез), гетеротрофами же прямо или косвенно используются вещества и энергия, ассимилированные автотрофами. В результате такого рода общения различных организмов со средой обитания устанавливается определенная связь элементарного состава живых организмов, взятых в их совокупности, с элементарным составом суммы неорганических компонентов (составных частей) окружающей их среды.

Сопоставление элементарного состава организмов с элементарным составом среды указывает как на известное качественное сходство, поскольку большая часть известных элементов входит в состав организмов, так и на значительное различие в количественном содержании отдельных элементов в составе организмов и неорганических веществ окружающей среды,— что является следствием активной функции процессов ассимиляции веществ, характерной для всякого организма (табл. 1).

Таблица 1

Расположенный по декадам средний элементарный состав воды океана (гидросферы), живых организмов и земной коры

Декады	Весовые %	Элементы в составе гидросферы	Элементы в составе живых организмов	Элементы в составе земной коры (атмосферы, гидросферы и литосферы)
I	$>10^{1}$	O, H	O, H	O, Si
II	10^{0}—10^{1}	Cl, Na	C, N, Ca	Al, Fe, Ca, Na, K, Mg, H
III	10^{1}—10^{0}	Mg	S, P, Si, K	C, Mn, Cl, S, P, Ti
IV	10^{-2}—10^{-1}	S, Ca, K	Mg, Fe, Na, Cl, Al	N, Ba, B, V, Li, Sr, Br, Cu, F
V	10^{-3}—10^{-2}	C, Br, Sr	Mn, B, Sr	Be, J, Co, Th, Zn, Pb, Mo, Rb, Sn
VI	10^{-4}—10^{-3}	B, F	Ba, Cu, Zn, Li, Ti, V	As, Cs, Hg, Bi, Cd, W
VII	10^{-5}—10^{-4}	Si, Rb, N, Zn, Ba	J, F, Br, Rb Sn, Ni, As, Mo, Co	La, As, Ag, Se, Te, Sb
VIII	10^{-6}—10^{-5}	Li, J, Fe, P, As, Al, Cu, Mn		Au, Pt
IX	10^{-7}—10^{-6}		Hg	He
XII	10^{-10}—10^{-9}	Ag, Au		
XIII XIV	10^{-12}—10^{-10}	Ra	Ra	Ra

Такие элементы, как O, H, C, N, S, P, K, Na, Mg, Ca, Fe и Cl, входящие в состав живых организмов в количестве от нескольких десятков до 10^{-2}%, носят название макроэлементов; они составляют основную массу органических и неорганических соединений организма. Элементы, содержащиеся в количестве от 10^{-2} до 10^{-5}% и носящие название микроэлементов, играют столь же существенную роль в составе организмов, так как многие из них участвуют в построении соединений с высокой биологической активностью: гормонов, ферментов, дыхательных пигментов и других веществ организма.

Организмы не только непрерывно поглощают вещества из окружающей их среды, но и столь же непрерывно выделяют конечные продукты своей диссимиляторной деятельности. Газообразные продукты при этом возвращаются в атмосферу, органические же соединения экскретов, как и органические соединения мертвых остатков организмов, подвергаются в главной своей массе, за счет жизнедеятельности многочисленных сапрофитов, полной минерализации.

Таким образом, если органические вещества живых организмов в главной своей части происходят за счет поглощаемой автотрофами угольной кислоты атмосферы (или угольной кислоты, растворенной в воде) и если в процессе дыхания организмами непрерывно потребляется газообразный кислород, то, с другой стороны, совокупность живых организмов создает как основную массу главных газов, образующих земную атмосферу, так и многие другие химические компоненты окружающей среды.

В результате всех этих многообразных процессов взаимодействия живого организма и окружающей среды, последняя не является по отношению к организму инертной и независимой от него; напротив, внешняя среда и организм находятся в той тесной связи, при которой они неотделимы друг от друга и немыслимы в отдельности.

Как явствует из данных элементарного состава, главную по весу часть живого организма составляет вода. Содержание воды в организмах в среднем колеблется от 70 до 90%; однако, у некоторых обитающих в воде беспозвоночных содержание воды может достигать 95—98%. В отдельных тканях и органах одного и того же организма содержание воды различно. Так, у высших млекопитающих среднее содержание воды в крови —80%, в мышцах —75%, в жировой ткани —30%, в костной ткани — 45%, в почках —80%, в печени —74%, в коже —70%. Вода играет важную роль, являясь универсальной средой биохимических процессов организма, значительная часть органических и неорганических соединений которого находятся в состоянии истинных или коллоидных растворов.

Сухой (плотный) остаток образуют неорганические и органические вещества, причем последние составляют наибольшую его часть. Только в костной ткани неорганические (минеральные)

вещества составляют бо́льшую часть всех плотных веществ. Так как тот или другой элемент может входить как в состав органических, так и неорганических (минеральных) соединений, то определение его суммарного содержания в тканях и органах еще не дает представления о форме, в которой он может там находиться; для этого необходимо раздельное исследование органических и неорганических соединений.

Содержание отдельных минеральных веществ в различных тканях и жидкостях организма различно, как это можно видеть из нижеследующей таблицы.

Таблица 2

Среднее содержание главных элементов минеральных соединений различных тканей, органов и жидкостей организма человека (в мг %)

Наименование	Na	K	Mg	Ca	Cl (хлоридов)	P (фосфатов)	S (сульфатов)
Кровь	175	210	4,3	5	280	2—4	1
Плазма	335	20	2,4	10,3	365	3,7	1,3
Эритроциты	23	420	6,6	0	190		
Лимфа	290	14	3	10	420	3,6	
Цереброспинальная жидкость	325	20	3	5	440	1,6	
Скелетные мышцы	70	280	21	7	60	18	6
Сердечная мышца	170	230	16	9	125		
Почки	165	165	20	19	210		7
Печень	150	170	17	10	125		20
Легкие	245	150	7,5	16	255		10
Панкреатическая железа	80	200	17	15	160		
Мозг	150	290	14	10,5	130	7	10
Костная ткань	160	55	95	9900	170	4550	
Хрящ	550	235	11	40	250	10	
Кожа	200	60	6	11	260		
Слюна	20	100	2	6	42	18	
Желчь	320	19	0,5	10	350	14	
Молоко (коровье)	60	150	14	125	115	85	

Для каждой отдельной клетки или для каждой отдельной ткани соотношение между различными входящими в их состав минеральными веществами, т. е. соотношение между различными катионами и анионами сохраняется довольно постоянным. Нарушение такого соотношения обычно более или менее тяжело отражается на жизненных функциях организма.

Основную массу органических веществ составляют белки (протеины), углеводы и липоиды. Кроме этих основных типов органических веществ в состав клеток входят многочисленные безазотистые и азотсодержащие органические вещества, являющиеся промежуточными или конечными продуктами реакций обмена

белков, углеводов и липоидов, или биологически высокоактивными соединениями. Изучение всех этих веществ, входящих часто в ничтожно малых количествах в состав клеток и тканей организма, наряду с изучением белков, углеводов и липоидов, имеет важное значение для понимания реакций обмена веществ в организме.

Работа 1. **Определение содержания воды и сухого остатка в крови**

В высушенный до постоянного веса стаканчик с притертой крышкой и плоским дном вносят 1 мл крови (можно брать и меньшее количество крови, напр., 0,1 мл), закрывают крышкой и взвешивают. Затем, сняв крышку, стаканчик ставят в сушильный шкаф и высушивают вместе с содержимым в течение двух часов при температуре 100—110° (не выше). Стаканчик закрывают крышкой и ставят в эксикатор и по охлаждении взвешивают, после чего снова ставят в сушильный шкаф и снова сушат 15 минут. Сушку и взвешивания продолжают до тех пор, пока не будет достигнут постоянный вес. Разность между весом стаканчика до и после сушки дает содержание воды во взятой навеске крови. Вычисляют содержание воды и плотного остатка в процентах.

Во избежание ошибок определение следует вести в двух параллельных опытах. Необходимо также переносить стаканчик только специальными щипцами или пинцетом, но не руками.

Содержание воды в цельной крови около 80% и сухого остатка около 20%. В сыворотке и плазме крови — воды около 90% и сухого остатка около 10%.

Работа 2. **Определение содержания воды и сухого остатка в мышечной ткани**

В тарированный стаканчик с притертой крышкой берут навеску 1—2 г измельченной мышцы, причем следят за тем, чтобы взятая навеска распределилась по возможности равномерным и не очень толстым слоем по дну стаканчика. Дальнейшее определение ведут так же, как и в предыдущей работе. Результат определения выражают в процентах.

Содержание воды в мышце около 70—75% и плотного остатка около 25—30%.

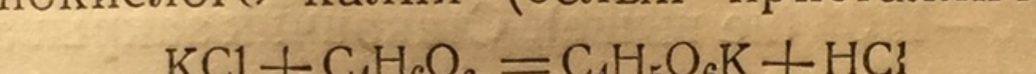
Работа 3. **Качественное открытие важнейших элементов, входящих в состав тканей**

В состав всех клеток и тканей организма входят углерод, кислород, водород и азот, составляющие основную массу органического вещества тканей и клеток. Кроме них в составе клеток обнаруживаются и многие другие элементы, как, например, сера, хлор, фосфор, натрий, калий, магний, железо и другие. Эти

элементы частью входят в состав органических веществ тканей, частью же находятся там в виде неорганических соединений. Для их качественного открытия исследуемую ткань подвергают минерализации сухим путем, вначале до образования углистого остатка, а затем до полного озоления.

5 г мышечной ткани или крови помещают в тигель и нагревают на пламени горелки до полного обугливания и прекращения выделения дыма. После охлаждения тигля образовавшийся уголь повторно экстрагируют небольшими порциями горячей воды. Водные вытяжки фильтруют через бумажный фильтр. В водную вытяжку переходят хлористые соли металлов первой и второй групп и сернокислые и фосфорнокислые соли металлов первой группы. Поэтому в полученной водной вытяжке открывают:

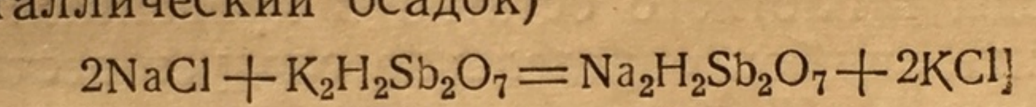
1) ион калия — добавлением раствора винной кислоты — в виде кислого виннокислого калия (белый кристаллический осадок):



$$KCl + C_4H_6O_6 = C_4H_5O_6K + HCl$$

и по окрашиванию пламени в краснофиолетовый цвет (наблюдают через призму с раствором индиго);

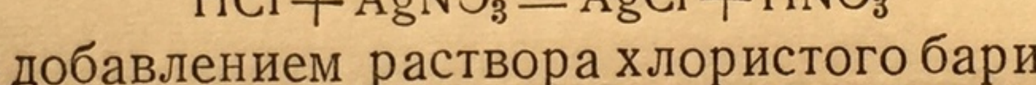
2) ион натрия — добавлением раствора кислого пиросурьмянокислого калия — в виде кислого пиросурьмянокислого натрия (белый кристаллический осадок)



$$2NaCl + K_2H_2Sb_2O_7 = Na_2H_2Sb_2O_7 + 2KCl$$

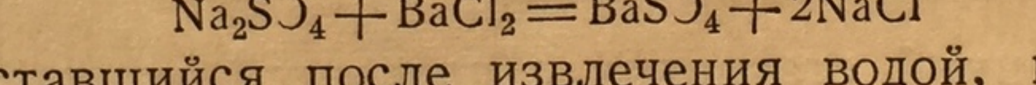
и по окрашиванию пламени в желтый цвет;

3) ион хлора — добавлением к вытяжке, подкисленной азотной кислотой, раствора азотнокислого серебра — в виде хлористого серебра (белый творожистый осадок):



$$HCl + AgNO_3 = AgCl + HNO_3$$

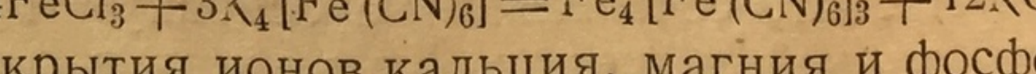
4) SO_4'' — добавлением раствора хлористого бария — в виде сернокислого бария (белый кристаллический осадок):



$$Na_2SO_4 + BaCl_2 = BaSO_4 + 2NaCl$$

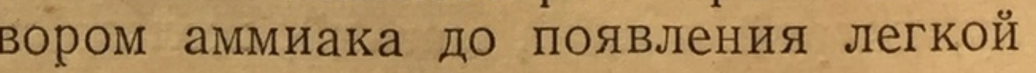
Уголь, оставшийся после извлечения водой, высушивают и прокаливают в тигле до полного озоления. Золу растворяют в 0,5%-ной соляной кислоте и раствор фильтруют. В полученном растворе находятся, главным образом, фосфаты металлов второй группы и соли трехвалентного железа.

1) Ион трехвалентного железа открывают или добавлением, к небольшой части солянокислого раствора, раствора роданистого калия (образование роданистого железа — красное окрашивание):



$$FeCl_3 + 3KCNS = Fe(CNS)_3 + 3KCl$$

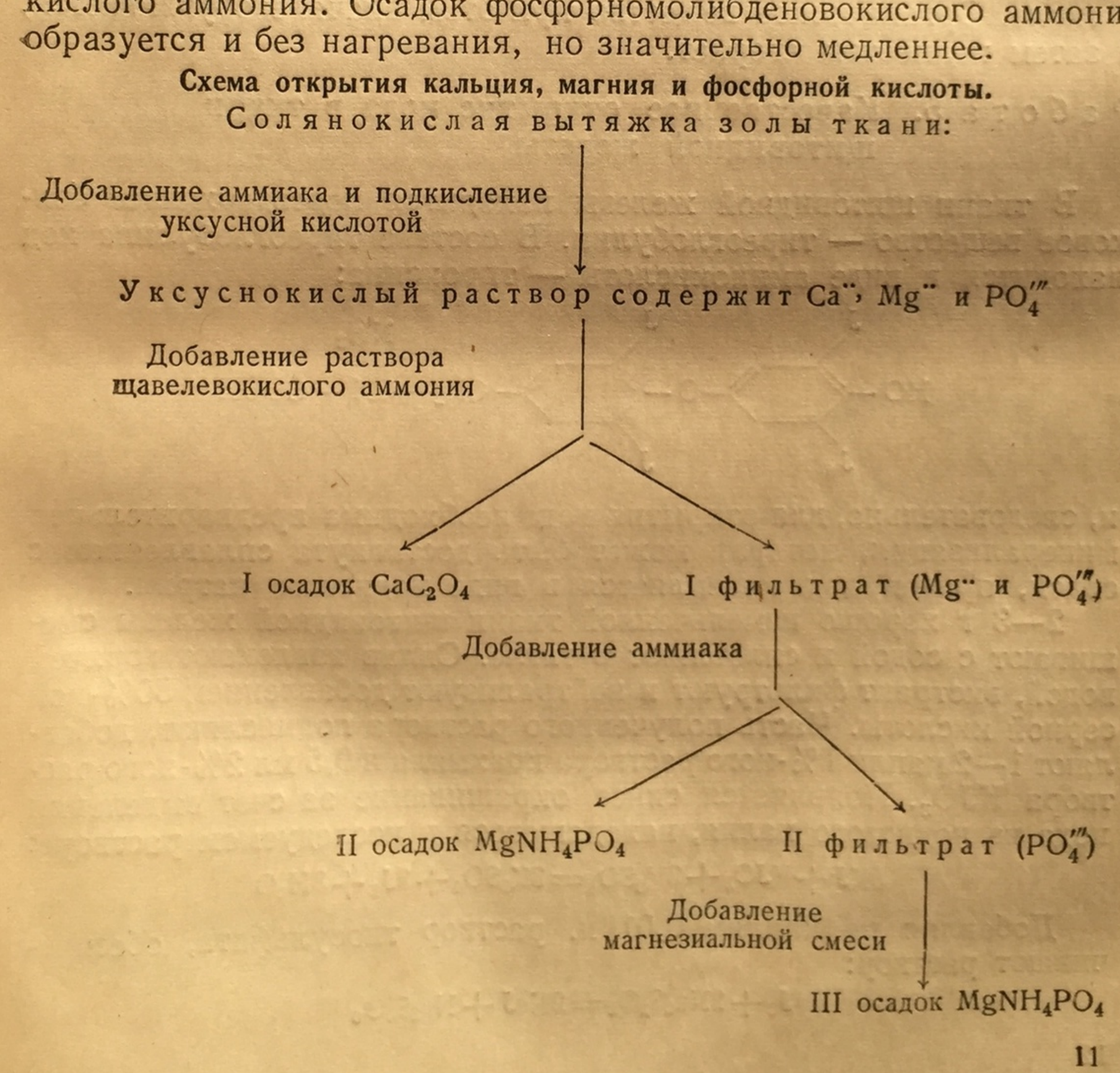
или добавлением раствора желтой кровяной соли (образование железистосинеродистой соли окиси железа — синее окрашивание):



$$4FeCl_3 + 3K_4[Fe(CN)_6] = Fe_4[Fe(CN)_6]_3 + 12KCl$$

2) Для открытия ионов кальция, магния и фосфорной кислоты остальную часть солянокислого раствора золы осторожно нейтрализуют раствором аммиака до появления легкой мути и затем

добавляют 10%-ную уксусную кислоту до растворения образовавшейся мути. В полученном теперь уксуснокислом растворе осаждают кальций добавлением раствора щавелевокислого аммония; образовавшийся осадок щавелевокислого кальция отфильтровывают и из фильтрата добавлением аммиака осаждают магний в виде фосфорноаммонийномагниевой соли (фосфорная кислота содержится в испытуемой жидкости). Отфильтровывают выпавший осадок и из фильтрата добавлением магнезиальной смеси осаждают фосфорную кислоту:



$$(NH_4)_2HPO_4 + MgSO_4 + NH_3 = MgNH_4PO_4 + (NH_4)_2SO_4$$

Для того, чтобы установить присутствие фосфорной кислоты в полученных осадках (II и III), их отфильтровывают, слегка промывают водой и растворяют на фильтре в разбавленной азотной кислоте. Азотнокислый раствор нагревают с раствором молибденовокислого аммония, причем выпадает желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония:

$$H_3PO_4 + 12(NH_4)_2MoO_4 + 21HNO_3 = \\ = (NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3 + 21NH_4NO_3 + 12H_2O$$

Необходимо употреблять достаточный избыток молибденовокислого аммония. Осадок фосфорномолибденовокислого аммония образуется и без нагревания, но значительно медленнее.

Схема открытия кальция, магния и фосфорной кислоты.

Солянокислая вытяжка золы ткани:

Добавление аммиака и подкисление уксусной кислотой

Уксуснокислый раствор содержит $Ca^{\cdot\cdot}$, $Mg^{\cdot\cdot}$ и PO_4'''

Добавление раствора щавелевокислого аммония

I осадок CaC_2O_4

I фильтрат ($Mg^{\cdot\cdot}$ и PO_4''')

Добавление аммиака

II осадок $MgNH_4PO_4$

II фильтрат (PO_4''')

Добавление магнезиальной смеси

III осадок $MgNH_4PO_4$

Работа 4. **Качественное исследование состава кости**

Минеральные вещества костной ткани составляют половину или большую часть сухого вещества ткани и состоят, главным образом, из фосфорнокислого и углекислого кальция. Кроме того, в состав минеральных веществ, образующих твердую часть кости, входят Mg, Na, Cl и F. Твердое неорганическое вещество костной ткани человека имеет состав, близкий к

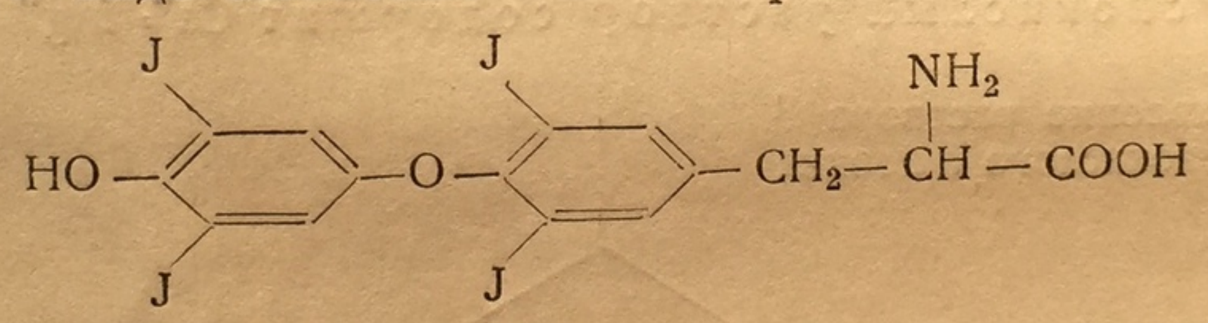
$$[Ca_{8,5}, Mg_{0,25}, Na_{0,19}]\,[(PO_4)_{5,07}\,(CO_3)_{1,24}]\,(H_2O)_{2,0}$$

Хорошо очищенные и грубо измельченные кости настаивают в течение нескольких дней с 0,5%-ной соляной кислотой. При этом минеральная часть кости переходит в раствор и остаются нерастворившиеся органические белковые вещества. В полученном кислом экстракте открывают присутствие Na, Ca, Mg, H_3PO_4 и Fe, как это указано в предыдущей работе.

Часть нерастворившегося органического вещества кости оставляют в кислом растворе для дальнейшего исследования (работа 119), а другую часть хорошо отмывают водой до почти полного исчезновения реакции на Cl′, после чего высушивают и сжигают в тигле. Органическое вещество при этом вначале обугливается, а затем полностью сгорает.

Работа 5. **Качественное открытие иода в ткани щитовидной железы**

В ткани щитовидной железы находится иодсодержащее белковое вещество — тиреоглобулин. В составе тиреоглобулина иод находится в виде аминокислоты — тироксина:



и, следовательно, для открытия иода необходима предварительная минерализация, которая может быть достигнута сплавлением с содой, причем иод отщепляется в виде иодистого натрия.

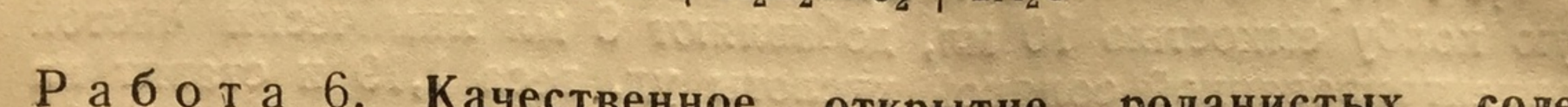
2—3 г хорошо измельченной ткани щитовидной железы смешивают с содой и сплавляют в тигле. Сплав извлекают горячей водой, экстракт фильтруют и нейтрализуют добавлением 50%-ной серной кислоты. Часть полученного раствора подкисляют, добавляют 1—2 капли 1%-ного раствора крахмала и 0,5 мл 2%-ного раствора KJO_3. Появляется синее окрашивание за счет выделения иода из иодистого калия, находящегося в исследуемом растворе:

$$5KJ + KJO_3 + 3H_2SO_4 = 3K_2SO_4 + 3J_2 + 3H_2O$$

Добавляя по каплям 0,01 н. раствор тиосульфата, обесцвечивают раствор:

$$J_2 + 2Na_2S_2O_3 = 2NaJ + Na_2S_4O_6$$

К другой части раствора после подкисления добавляют немного 3%-ного раствора перекиси водорода и 1—2 капли раствора крахмала. Синее окрашивание указывает на выделение иода.

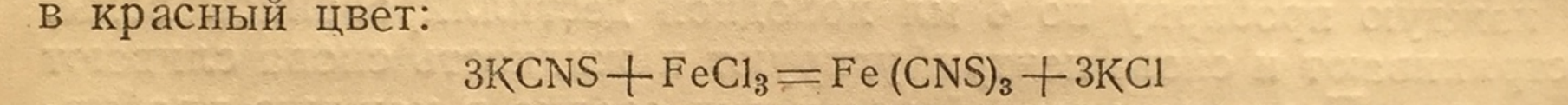


$$2HJ + H_2O_2 = J_2 + 2H_2O$$

Работа 6. Качественное открытие роданистых солей в слюне человека

В некоторых случаях для того, чтобы обнаружить те или другие катионы и анионы, нет надобности прибегать к минерализации или частичному разрушению органических веществ. Это относится к отдельным случаям открытия и количественного определения неорганических веществ в жидкостях организма. Само собой разумеется, что элементы, связанные в виде органических соединений, обычными качественными реакциями, без предварительной минерализации, обнаружены быть не могут.

Для открытия роданистых солей в слюне 2 мл слюны подкисляют соляной кислотой и добавляют 2—3 капли сильно разбавленного раствора хлорного железа. Жидкость окрашивается в красный цвет:



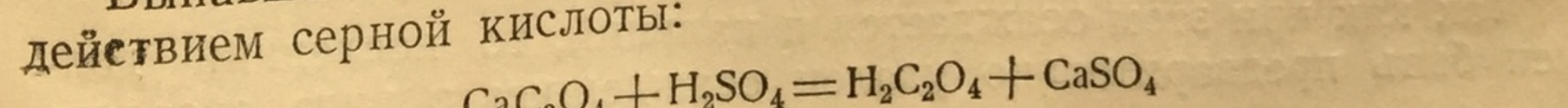
$$3KCNS + FeCl_3 = Fe(CNS)_3 + 3KCl$$

Вместо раствора хлорного железа часто пользуются бумагой, смоченной раствором $FeCl_3$, на которую наносят каплю подкисленной слюны. Реакция на роданистые соли выходит особенно отчетливо с слюной курильщиков, где роданистых солей больше.

Работа 7. Определение кальция в мышечной ткани по Ретинскому

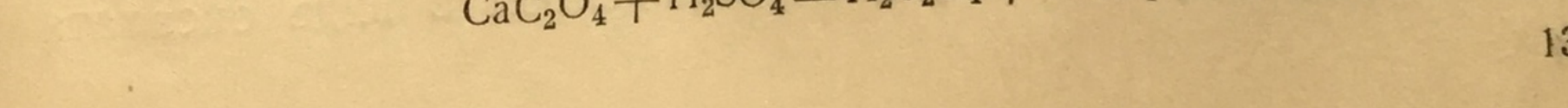
Для определения кальция в тканях необходимо прежде всего разрушить органическую часть ткани, которая препятствует определению. С этой целью можно подвергнуть ткань или озолению на пламени горелки, или гидролитическому расщеплению органических веществ ткани, которые при этом превращаются, в большей своей части, в легко растворимые и не мешающие определению кальция вещества. В отдельных случаях, впрочем, как например, в сыворотке крови, возможно и непосредственное определение без предварительной минерализации или разрушения органической части ткани.

Само определение кальция основано на его осаждении щавелевокислым аммонием.



$$CaCl_2 + (NH_4)_2C_2O_4 = CaC_2O_4 + 2NH_4Cl$$

Выпавший щавелевокислый кальций отделяется, разлагается действием серной кислоты:



$$CaC_2O_4 + H_2SO_4 = H_2C_2O_4 + CaSO_4$$

и выделившаяся щавелевая кислота титруется раствором перманганата:

$$5H_2C_2O_4 + 2KMnO_4 + 3H_2SO_4 = 10CO_2 + 2MnSO_4 + K_2SO_4 + 8H_2O$$

1,0 г хорошо измельченной мышечной ткани помещают в мерную колбу емкостью 10 мл, добавляют 6 мл химически чистой концентрированной соляной кислоты уд. веса 1,19 и ставят на кипящую водяную баню на 8—9 часов. Затем содержимое колбы охлаждают, добавляют до метки дестиллированную воду и, тщательно перемешав, фильтруют через двойной обеззоленный фильтр в сухую колбочку. Фильтрат может быть желтовато или коричневато окрашенным, но должен быть совершенно прозрачным.

В две конусообразные центрифужные пробирки емкостью 15 мл помещают в каждую по 4 мл полученного фильтрата и по 3 мл насыщенного раствора щавелевокислого аммония и, добавив 1—2 капли раствора метилрот, нейтрализуют смесь добавлением раствора аммиака. Пробирки оставляют стоять 10—12 часов для полного выпадения осадка щавелевокислого кальция.

Пробирки уравновешивают добавлением воды в более легкую из них и центрифугируют, сливают жидкость с осадка, добавляют в каждую пробирку по 4 мл холодной дестиллированной воды, встряхивают и снова центрифугируют и жидкость снова сливают с осадка. После двукратной промывки осадка в каждую пробирку наливают по 2 мл 5%-ной серной кислоты и нагревают на водяной бане 5 минут, причем происходит освобождение щавелевой кислоты. Теперь, охладив содержимое пробирок, титруют его из микробюретки 0,01 н. $KMnO_4$ до появления стойкого слаборозового окрашивания.

Из затраченных на титрование объемов 0,01 н. $KMnO_4$ берут среднее и вычитают 0,01 мл для устранения обычной при таком титровании ошибки на появление окраски. Результат определения выражают в мг Са на 100 г исследуемой ткани, т. е. в мг %. Так как 1 мл 0,01 н. $KMnO_4$ согласно вышеприведенным уравнениям реакций отвечает 0,2 мг Са (атомн. вес 40,07), то, умножая эту величину на объем перманганата, деля на взятую для определения часть (0,4) навески, выраженной в граммах, и умножая результат на 100, находят содержание Са в мг%.

Содержание Са в скелетных мышцах крупного рогатого скота 5—7 мг%. В тканях Са находится частью в виде неорганических солей в растворах, а частью связан с белковыми веществами тканей.

Работа 8. **Определение кальция и магния в сыворотке крови**

Для определения магния пользуются осаждением его в виде аммонийномагниевой соли фосфорной кислоты:

$$MgCl_2 + H_3PO_4 + 3NH_3 = MgNH_4PO_4 + 2NH_4Cl$$

Так как при этом осаждается и кальций, то последний должен быть предварительно удален осаждением в виде оксалата

кальция. Целесообразно поэтому объединить определение магния и кальция, причем после определения кальция, по методу аналогичному изложенному в предыдущей работе, в фильтрате после осаждения CaC_2O_4 определяется магний. При определении кальция и магния в сыворотке крови нет необходимости в озолении или иного рода разрушении органических веществ, но при определении их в других объектах, например в цельной крови, необходимо озоление, которое обычно достигается сухим путем — сожжением и озолением на пламени.

В две конусообразные центрифужные пробирки помещают по 1 мл прозрачной сыворотки, добавляют по 0,5—1,0 мл насыщенного раствора щавелевокислого аммония, перемешивают, вращая пробирки, и оставляют на 30 минут для полного выпадения осадка оксалата кальция. Затем, уравновесив пробирки, центрифугируют, жидкость над осадком осторожно сливают или снимают маленькой пипеткой и переносят в центрифужные пробирки для определения магния (см ниже). Добавляют к осадку по 1—2 мл холодной дестиллированной воды, взмучивают и затем центрифугируют. Промывную воду снимают с осадка и переносят в центрифужные пробирки для определения магния, присоединяя к основному раствору. Повторяют эту промывку осадка еще один раз.

К осадкам в пробирках добавляют по 0,5 мл 50%-ной H_2SO_4. Осадок взмучивают и ставят пробирки на кипящую водяную баню для полного растворения осадка. После охлаждения содержимое пробирок титруется из микробюретки 0,01 н. $KMnO_4$ (титр которого установлен по 0,01 н. $(COOH)_2$) до неисчезающего слаборозового окрашивания. Из найденного спуска $KMnO_4$ вычитают 0,01—0,02 мл, как поправку на образование окраски. Таким образом, если, например, в результате титрования израсходовано 0,52 мл 0,01 н. $KMnO_4$, то, учитывая поправку, находят 0,52—0,02=0,50. Содержание Са в мг % будет очевидно: $0,5 \times 0,2 \times 100 = 10,0$ мг%.

Центрифугаты и промывные воды общим объемом 6—7 мл, собранные при определении кальция в широкие прямые центрифужные пробирки (см. выше), служат для определения магния. В пробирки добавляют по 1 мл 5%-ного раствора фосфорнокислого аммония и 2 мл концентрированного раствора аммиака и оставляют на 12 часов для полного осаждения $MgNH_4PO_4$. Затем пробирки, уравновесив, центрифугируют и осторожно удаляют раствор, находящийся над осадком. Добавляют к осадку 2 мл 10%-ного аммиака, взмучивают, центрифугируют и удаляют жидкость. Эту промывку осадка повторяют еще один раз.

Теперь к промытому осадку добавляют в каждую пробирку по 2 мл 10%-ной азотной кислоты, при этом осадок растворяется. Затем добавляют 1 мл 30% азотнокислого аммония и 1 мл 3% молибденовокислого аммония и смесь нагревают 5 минут на кипящей водяной бане. При этом за счет той фосфорной кислоты, которая была до растворения связана в осадке $MgNH_4PO_4$, обра-

зуется желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония по уравнению:

$$H_3PO_4 + 12(NH_4)_2MoO_4 + 23HNO_3 = \\ = (NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3 \cdot 2HNO_3 + 21NH_4NO_3 + 12H_2O$$

По охлаждении на поверхность раствора в пробирках добавляют 1 мл спирта для того, чтобы уменьшить поверхностное натяжение жидкости и осадить плавающую на ней часть осадка. Затем пробирки уравновешивают добавлением спирта и центрифугируют. Желтый осадок собирается плотно на дне. Жидкость удаляется осторожным сливанием или пипеткой и осадок три-пять раз промывают 1%-ным раствором KNO_3. После третьего-четвертого раза сливаемый раствор испытывают лакмусовой бумагой и если бумажка краснеет, продолжают промывку далее, чтобы полностью удалить избыточную HNO_3. Когда вся избыточная кислота отмыта, осадок растворяют в точно отмеренном, с помощью пипетки или микробюретки, 1 мл 0,04 н. NaOH. Фосфорномолибденовокислый аммоний реагирует с NaOH по уравнению:

$$(NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3 \cdot 2HNO_3 + 26NaOH = \\ = (NH_4)_3PO_4 + 2NaNO_3 + 12Na_2MoO_4 + 14H_2O.$$

Теперь добавляют одну каплю фенолфталеина и избыток NaOH титруют из микробюретки 0,04 н. H_2SO_4 до исчезновения красного окрашивания.

Как видно из описанного хода работы и вышеприведенных уравнений реакций, магний определяется не прямо, а косвенно, путем определения фосфорной кислоты, осаждающейся с магнием в осадке $MgNH_4PO_4$. Из уравнений реакций следует, что 26 эквивалентов NaOH отвечают одной молекуле H_3PO_4 и, следовательно, одному атому Mg. Таким образом, 1 мл 0,04 н. NaOH отвечает $24{,}32 : (26 \times 25) = 0{,}03745$ мг Mg.

Следовательно, если при титровании пошло в одном случае 0,45 и в другом 0,47 мл 0,04 н. H_2SO_4, то значит связано 0,53 и 0,55 мл NaOH. Среднее 0,54 мл 0,04 н. NaOH. Отсюда содержание магния в мг% в исследуемой сыворотке:

$$0{,}54 \cdot 0{,}03745 \cdot 100 = 2{,}022 \text{ мг}\%.$$

Если желают определить кальций и магний в цельной крови, то 1 мл крови нагревают в фарфоровом тигле до полного озоления, золу растворяют в нескольких каплях разбавленной соляной кислоты и сливают, ополаскивая небольшим количеством воды, в центрифужную пробирку, и далее поступают, как уже указано выше.

Содержание кальция в крови 5,3—6,7 мг%, а в сыворотке 9,0—11,0 мг%. Содержание магния в крови 2,3—4,0 мг%, а в сыворотке 1,6—3,5 мг%.

Работа 9. Определение неорганического, органическогои общего фосфора в сыворотке крови

Если после полной минерализации какой-либо ткани определить содержание фосфора, то определяется так называемый общий фосфор, который представляет собою сумму различных фракций фосфора, находящихся в ткани. Общий фосфор составляется:

1) фосфором неорганических солей (неорганический фосфор), 2) фосфором органических соединений, растворимых в кислотах, 3) фосфором липоидов, например, фосфатидов и 4) фосфором белковых веществ, например, нуклеопротеидов, выпадающих в осадок при действии кислот. Практически при диференцированном определении различных форм фосфора, содержащихся в ткани, определяют: 1) неорганический фосфор в фильтрате после осаждения белков ткани, 2) кислоторастворимый фосфор — после минерализации безбелкового фильтрата, 3) органический фосфор (белков и липоидов) — после минерализации белкового осадка и 4) липоидный фосфор — после извлечения липоидов из ткани жирорастворителем и минерализации полученного экстракта. Таким образом, кислоторастворимый фосфор является суммой неорганического фосфора и фосфора органических соединений, растворимых в кислотах, и последний может быть найден как разность между кислоторастворимым и неорганическим фосфором. По разности между органическим и липоидным фосфором можно определить фосфор белковой фракции. Впрочем, такие определения по разности отдельных фракций фосфора не являются вполне безупречными и иногда могут приводить к значительным ошибкам.

При определении неорганического и органического фосфора в сыворотке крови прежде всего осаждают белки и затем в осадке после минерализации определяют органический фосфор (фосфор белков и липоидов), а в безбелковом фильтрате — неорганический фосфор.

1 мл сыворотки помещают в центрифужную пробирку, прибавляют 1 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты, перемешивают тонкой стеклянной палочкой, оставляют стоять 15 минут и центрифугируют. Прозрачный раствор осторожно переносят в другую чистую и сухую центрифужную пробирку, а к осадку добавляют еще 1 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты, перемешивают той же стеклянной палочкой и снова центрифугируют. Прозрачный центрифугат соединяют с предыдущим.

Теперь к прозрачному, не содержащему белка раствору, отвечающему 1 мл взятой сыворотки, добавляют 1 мл 30%-ного азотнокислого аммония, 0,4 мл концентрированной азотной кислоты и 1 мл 3%-ного молибденовокислого аммония, перемешивают, вращая пробирку, и ставят затем на 5 минут на кипящую водяную баню. При этом жидкость становится желтовато-зе-

леной и выпадает осадок желтого цвета, образующийся по уравнению

$$H_3PO_4 + 12(NH_4)_2MoO_4 + 23HNO_3 = \\ = (NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3 \cdot 2HNO_3 + 21NH_4NO_3 + 12H_2O$$

Охлаждают содержимое пробирки, наслаивают 1 мл спирта для уменьшения поверхностного натяжения жидкости и лучшего осаждения плавающих на поверхности твердых частиц и центрифугируют. Жидкость сливают с осадка, добавляют 3—5 мл 1%-ного KNO_3, взмучивая осадок, и затем снова центрифугируют и сливают жидкость. Подобную промывку осадка повторяют два-три раза до тех пор, пока не исчезнет кислая на лакмус реакция промывного раствора и, следовательно, пока не будет отмыта вся избыточная азотная кислота.

Теперь растворяют осадок, добавляя точно отмеренный объем 0,04 н. NaOH. Для этого берут 1 или 2 мл такого раствора и, встряхивая, постепенно растворяют осадок. При этом протекает следующая реакция:

$$(NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3 \cdot 2HNO_3 + 26NaOH = \\ = (NH_4)_3PO_4 + 12Na_2MoO_4 + 2NaNO_3 + 14H_2O$$

По окончании растворения к жидкости добавляют каплю фенолфталеина и избыточный NaOH оттитровывается из микробюретки 0,04 н. H_2SO_4 до исчезновения розовой окраски. По разности находят число (a) мл 0,04 н. NaOH, отвечающих потребленному в реакции количеству щелочи. Так как 26 граммэквивалентов NaOH, согласно уравнению реакции, соответствует одной молекуле H_3PO_4, или 31,04 г P, то 1 мл 0,04 н. NaOH отвечает 31,04: $(26 \times 25) = 0{,}0478$ мг P. Таким образом, содержание неорганического фосфора в исследуемой сыворотке будет $0{,}0478 \cdot a \cdot 100 =$ = мг% P.

Промытый белковый осадок количественно переносят теперь с помощью небольшого объема дестиллированной воды из пробирки в фарфоровый тигель, осторожно высушивают и полностью озоляют прокаливанием тигля. Для ускорения озоления можно добавить каплю смеси концентрированных HNO_3 и H_2SO_4 (1:1). Золу растворяют в 0,5 мл 20%-ной HNO_3, переносят жидкость в центрифужную пробирку и тигель два-три раза споласкивают 0,5 мл 20%-ной HNO_3. Теперь к раствору в пробирке добавляют 1 мл 30%-ного азотнокислого аммония и 1 мл 3%-ного молибденовокислого аммония и далее ведут определение также, как описано выше. Таким образом определяется органический фосфор, содержание которого выражают также в мг % P.

Следует заметить, что результаты определения фосфора выражаются или в виде P, или же в виде H_3PO_4. Поэтому полезно в скобках при найденном результате указывать, в виде чего он выражен. Для перевода результатов, выраженных в мг % H_3PO_4,

в мг% Р их следует умножать на 0,316. Оба упомянутые определения необходимо вести в двух параллельных опытах.

Для определения общего фосфора сыворотки 1 мл ее предварительно озоляют нагреванием, а затем прокаливанием в тигле. При этом добавляют одну-две капли смеси концентрированных HNO_3 и H_2SO_4 (1:1). В дальнейшем ведут определение так же, как и органического фосфора.

По разности между найденными величинами для общего фосфора и органического фосфора находят кислоторастворимый фосфор.

Содержание общего фосфора в сыворотке около 7,5—13,0 мг % Р, неорганического около 3—5 мг%Р, кислоторастворимого 4—6 мг%Р.

Работа 10. **Определение хлора в мышечной ткани или крови**

После разрушения органической части ткани обугливанием, хлориды извлекаются водой и в водном экстракте определяются титрованием азотнокислым серебром:

$$NaCl + AgNO_3 = AgCl + NaNO_3$$

в присутствии K_2CrO_4, который с избыточным $AgNO_3$ образует Ag_2CrO_4 красного цвета.

Навеску около 5 г крови или мышечной ткани осторожно нагревают в тигле до полного обугливания. При этом необходимо следить за тем, чтобы обугливание было действительно полным, т. е. чтобы уголь не содержал смолистых веществ. Полученный уголь повторно экстрагируют горячей водой и вытяжки фильтруют, избегая потерь, в мерную колбу на 100 мл. Жидкость должна быть совершенно бесцветной и прозрачной. По окончании экстрагирования доводят жидкость в колбе до метки добавлением дестиллированной воды. Из полученного раствора отбирают пипеткой 20 мл, добавляют несколько капель раствора хромовокислого калия и титруют 0,01 н. раствором азотнокислого серебра до появления кирпично-красного окрашивания. По объему пошедшего на титрование раствора азотнокислого серебра (из двух совпадающих титрований) рассчитывают содержание хлора в исследуемой ткани, выражая результаты в мг% хлора на вес ткани. Так, например, если при титровании 20 мл водного экстракта угля, полученного при обугливании 5 г крови, пошло 8 мл 0,01 н. раствора азотнокислого серебра, то в 100 г исследуемой крови содержится $0{,}355 \times 8 \times 5 \times 20 = 284$ мг хлора. Следовательно, содержание хлора в крови 284 мг%.

Так как хлор находится в тканях главным образом в виде NaCl, то результаты можно выразить в мг% NaCl. Для этого вычисленный результат надо умножить на NaCl/Cl=1,65. В норме содержание хлоридов в крови 450—560 мг% NaCl. В скелетных мышцах хлора значительно меньше, чем в крови (около 70 мг% Cl).

Работа 11. **Определение хлора в крови по Рушняку**

Ткань полностью минерализуется нагреванием с $KMnO_4$ в кислой среде, причем добавляется избыток $AgNO_3$, количественно связывающий хлор в виде AgCl. После удаления избытка $KMnO_4$ избыток $AgNO_3$ оттитровывается раствором роданида по Фольгарду:

$$AgNO_3 + NH_4CNS = AgCNS + NH_4NO_3$$

По количеству связанного $AgNO_3$ вычисляют содержание хлора или NaCl в ткани.

Определение ведут в двух параллельных пробах. В две маленькие конические колбы наливают приблизительно по 2—3 мл дестиллированной воды. Затем с помощью микропипетки приливают в каждую по 0,2 мл крови, по 2 мл 0,01 н. раствора азотнокислого серебра и по 0,5 мл концентрированной азотной кислоты (уд. веса 1,4). Осторожно нагревают на сетке до кипения и добавляют по каплям насыщенный раствор марганцевокислого калия до неисчезающего розового окрашивания. Кипятят снова 5—10 минут и к еще горячей окрашенной жидкости прибавляют несколько кристаллов глюкозы для раскисления избытка перманганата. Жидкость становится бесцветной и прозрачной; на дне колбы собираются белые хлопья хлористого серебра.

По охлаждении добавляют около пяти капель раствора железоаммиачных квасцов в качестве индикатора и титруют из микробюретки избыток несвязанного хлоридами ткани серебра 0,01 н. раствором роданистого аммония до появления розового окрашивания.

Затем, вычитая найденный объем из всего объема 0,01 н. раствора азотнокислого серебра, взятого для определения, находят количество серебра, связанное хлоридами ткани. Результат определения выражают в виде мг% хлора на объем взятой для исследования крови. Например, если на 0,2 мл крови было израсходовано 2 мл 0,01 н. раствора азотнокислого серебра, а при обратном титровании пошло 0,5 мл 0,01 н. раствора роданистого аммония, то в 0,2 мл крови содержится $0{,}335 \cdot 1{,}5 = 0{,}5325$ мг хлора, а в 100 мл крови 266 мг (266 мг% Cl).

Для того, чтобы избежать возможной ошибки за счет содержания хлора в применяемых при определении реактивах, ставят контрольный опыт без добавления крови. Результат вычитают из найденного в основном определении содержания хлора в крови.

Работа 12. **Определение общего азота мышечной ткани или крови по Кьельдалю**

После полной минерализации ткани определяется весь азот, перешедший в неорганическую форму аммиака. Этот общий азот представляет сумму азота белковых веществ, азота полипептидов и аминокислот и азота других органических веществ, входящих в состав ткани. На долю азота собственно неорганических соеди-

нений, т. е. аммонийных солей, если они имеются, приходится лишь ничтожная доля общего азота.

Способ определения общего азота по Кьельдалю основан на том, что органические азотсодержащие вещества ткани количественно окисляются серной кислотой в присутствии каталитически ускоряющих это окисление веществ (сернокислая медь, ртуть, селен, Na_2SeO_3 и др.). Азот окисляемых веществ при этом минерализуется и находится в серной кислоте в виде сернокислого аммония. Добавлением избытка щелочи аммиак вытесняется, отгоняется и поглощается в избытке 0,1 н. серной кислоты. Избыток кислоты оттитровывается и по количеству связанной кислоты вычисляется количество поглощенного аммиака, или соответствующее ему количество азота.

1 г измельченной мышечной ткани (или 1 мл крови) вносят в колбу Кьельдаля емкостью 100 мл. Добавляют в колбу 0,3 г сернокислой меди, 2 г сернокислого калия и 10 мл концентрированной серной кислоты и нагревают смесь при кипении до полного исчезновения буроватой, а затем желтоватой окраски. После того, как жидкость приобрела чистый зеленовато-голубой цвет, нагревают еще 30 минут, охлаждают, разбавляют в той же колбе водой и количественно переливают в колбу для отгонки. Два-три раза споласкивают колбу Кьельдаля небольшим объемом воды и сливают воду в ту же колбу для перегонки. Затем к совершенно холодной жидкости в колбе для отгонки прибавляют немного талька в порошке (для равномерного кипения) и приливают избыточное, по сравнению с необходимым для нейтрализации 10 мл концентрированной серной кислоты, количество 30%-ного раствора едкого натра. Тотчас закрывают колбу пробкой с насадкой-предохранителем, соединенной с холодильником. Заранее трубку с предохранительным шаром на конце холодильника погружают в 30 мл 0,1 н. серной кислоты, которые налиты в коническую колбу-приемник и к которым добавлено несколько капель лакмоида, метилоранжа или метилрот (в качестве индикатора). Жидкость в колбе для отгонки перемешивают и нагревают до кипения. При этом аммиак перегоняется в приемник и здесь поглощается кислотой. Перегонку продолжают до прекращения отгонки аммиака. Конец отгонки определяют, пробуя стекающую из холодильника жидкость красной лакмусовой бумагой. Отсутствие посинения бумажки указывает на конец отгонки. После этого опускают колбу-приемник таким образом, чтобы трубка, по которой стекает жидкость из холодильника, не касалась серной кислоты в приемнике, и через 5—10 минут после этого перегонку прекращают. Теперь титруют жидкость в приемнике 0,1 н. раствором едкого натра до перехода розовой окраски в желтую (если был прибавлен метилоранж или метилрот). Пошедший на титрование объем 0,1 н. раствора едкого натра вычитают из всего объема взятой 0,1 н. серной кислоты и таким образом находят объем кислоты, отвечающий поглощенному аммиаку.

Теперь вычисляют содержание азота в исследуемой ткани в процентах. Если, например, на титрование избытка кислоты пошло 5,0 мл 0,1 н. щелочи, то количество связанной кислоты будет 30—5=25 мл. Так как каждый мл 0,1 н. кислоты отвечает 0,0017 г аммиака, или 0,0014 г азота, то содержание азота в мышечной ткани будет 0,0014×25×100=3,5%. Содержание общего азота в скелетных мышцах 3—4%. Кровь в норме содержит 2,5—3,5% общего азота.

Сернокислый калий в порошке для минерализации ввиду возможного содержания аммонийных солей предварительно прокаливается, а затем контролируется на отсутствие аммонийных солей с реактивом Несслера. Если же желают совершенно исключить

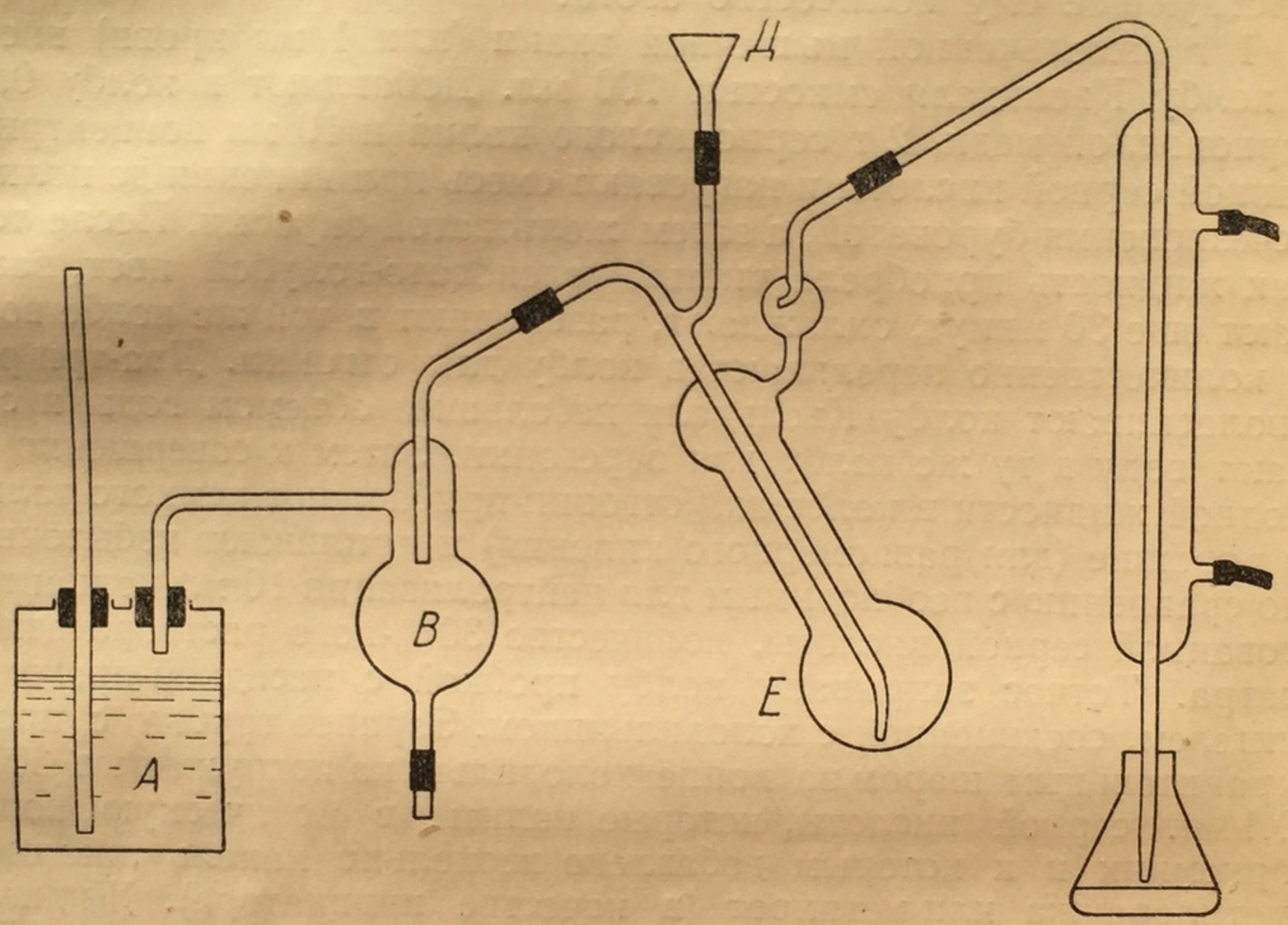


Рис. 1. Прибор Широкова-Пальмина для отгонки аммиака.

возможную ошибку за счет нечистоты реактивов, то ставят контрольный опыт, который ведут так же, как описано выше, но без прибавления ткани. Количество 0,1 н. кислоты, оказавшееся связанным в контрольном опыте, вычитают из результата основного опыта.

Вместо обычной перегонки аммиака целесообразно вести отгонку с водяным паром, пользуясь прибором Широкова-Пальмина, изображенным на рис. 1. При этом, 1,0 г мышцы или крови минерализуют, как это описано выше, по охлаждении содержимое кьельдалевской колбы количественно переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят водой до метки. Отбирают 10 мл жидкости и через воронку *Д* вносят в колбу *Е* прибора, смывая остатки с воронки дестиллированной водой.

В коническую колбу-приемник наливают 30—40 мл 0,01 н. раствора серной кислоты и опускают в нее тонкий конец холодильника. Закрывают нижнее отверстие предохранительного сосуда *В* и пускают пар через колбу *Е*. После этого через воронку *Д* наливают в колбу *Е* достаточное для полной нейтрализации кислоты количество раствора едкого натра и заменяют воронку *Д* стеклянной палочкой.

Отгонку с водяным паром продолжают до тех пор, пока в коническую колбу не отгонится 50—60 мл жидкости. В этот момент, обычно, аммиак полностью отогнан. Отнимают коническую колбу-приемник, споласкивая в нее конец холодильника дестиллированной водой, и титруют избыток кислоты 0,01 н. раствором едкого натра. Если при этом на титрование пошло 15 мл 0,01 н. едкого натра, а взято было 0,01 н. кислоты 35 мл, то связано аммиаком 20 мл кислоты и, следовательно, содержание азота в исследуемой ткани $0{,}00014 \times 20 \times 10 \times 100 = 2{,}8\%$.

Для освобождения колбы *Е* от остатков жидкости открывают нижнее отверстие предохранительного сосуда *В* и вытесняют жидкость из *Е* воздухом, присоединив резиновую грушу к концу холодильника. Затем колбу *Е* можно промыть, наполняя ее через воронку *Д* водой и снова вытесняя воду через сосуд *В*.

ГЛАВА II

АКТИВНАЯ РЕАКЦИЯ СРЕДЫ И БУФЕРНЫЕ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМА

«Физиологическое совершенство, непонятное как непосредственное приобретение за период индивидуального развития, может быть понято как наследие несметных веков исторического процесса».

К. А. Тимирязев.

Характерной особенностью живой клетки является обнаруживаемое у нее отличие активной реакции от активной реакции окружающей ее среды и, в известных пределах, значительная независимость и постоянство этой реакции, достигаемое непрерывно действующими системами живой клетки, назначение которых состоит в поддержании этого постоянства [H·]. Это постоянство [H·] клетки имеет исключительно большое значение для ее жизнедеятельности, так как обеспечивает постоянство режима внутриклеточных биохимических процессов и возможность процессов обмена между клеткой и внешней средой.

Активная реакция клеток и тканей животного организма близка как нейтральной, но несколько, повидимому, различна для различных тканей:

Кровь	pH 7,35—7,45
Соединительная ткань . . .	pH 7,2—7,4
Кожный эпителий	pH 5,5
Почки	pH 7,2—7,4
Мышечный сок	pH 6,8—6,9

Жидкости, выделяемые организмом во внешнюю среду, могут обладать [H·] резко отличной от нейтральной. Высокая кислотность, например, присуща желудочному соку (pH=1—2). Кислую реакцию (pH=5—6) имеет обычно и моча плотоядных животных (моча растительноядных имеет щелочную реакцию). Наоборот, щелочную реакцию имеют желчь (pH=7,8—8,6) и сок поджелудочной железы (pH=7,5—8,0).

Исследование [H·] различных клеток, тканей и других биологических объектов, а также [H·] характерной для отдельных биохимических процессов, имеет значение не только для изучения этих процессов in situ, но и для выяснения условий, при которых они могут быть воспроизведены экспериментально (in vitro).

Постоянство активной реакции ([H·]) живой клетки поддерживается теми буферными системами, которыми располагает клетка, и, с другой стороны, непрерывным освобождением клетки от конечных продуктов обмена веществ путем экскреции в окружающую среду. Так как в процессах обмена веществ образуются преимущественно кислые продукты, то в живой функционирующей клетке имеется тенденция к сдвигу [H·] в кислую сторону. Образующиеся кислоты связываются буферными системами клетки, которые обладают ограниченной емкостью и не в состоянии были бы сохранить [H·] клетки в достаточно узких границах, если бы не происходила постоянная и непрерывная экскреция продуктов обмена в окружающую среду, являющаяся вторым, весьма существенным, механизмом сохранения относительно постоянного значения pH живой клетки.

У простейших одноклеточных и многоклеточных животных организмов освобождение от продуктов внутриклеточного обмена происходит путем непосредственного обмена между клеткой и внешней средой. У более высокоорганизованных животных появляется обособленная от внешней среды тканевая жидкость, которая приобретает значение внутренней среды организма, и обмен клеток происходит непосредственно с этой жидкостью и лишь при ее участии с внешней для организма средой. У позвоночных животных, имеющих развитую замкнутую сосудистую систему, внутри организма циркулируют две жидкости: кровь и лимфа.

Кровь и лимфа находятся в теснейшей между собою связи и обеспечивают функции внутренней среды организма. Лимфа является собственно тканевой жидкостью и клетки тканей находятся с ней в непосредственном обмене; а кровь, связанная, с одной стороны, с лимфой и, с другой — с экскреторными органами, обеспечивает обмен с окружающей организм средой. Таким образом, кислые продукты внутриклеточного обмена — угольная, фосфорная и нелетучие органические кислоты выводятся в тканевую жидкость и попадают затем в кровь. Кровь высших животных имеет довольно постоянную [H·] и в пределах нормы возможны лишь незначительные сдвиги pH крови. Такое постоянство активной реакции среды достигается благодаря наличию в крови ряда буферных систем:

$$\frac{H_2CO_3}{NaHCO_3};\ \frac{BH_2PO_4}{B_2HPO_4};\ \frac{HPr\ (\text{плазмы})}{BPr\ (\text{плазмы})};\ \frac{HHb}{BHb};\ \frac{HHbO_2}{BHbO_2}$$

Из этих буферных систем главная часть бикарбонатного буфера, протеиновый буфер и часть фосфатного находятся в плазме, а гемоглобиновый и другая часть фосфатного буфера находятся в эритроцитах. Совместное действие всех перечисленных буферных систем обеспечивает постоянство [H·] крови, которая, если ее выразить в величинах pH, колеблется в норме у человека между 7,35—7,45, т. е. в пределах 0,1 pH. Возможные прижиз-

ненные колебания pH крови, однако, значительно шире от pH 7,0 до pH 7,8. Покисление крови до pH 7,0 (ацидоз) наблюдается при накоплении кислот (недостаточное освобождение от CO_2 или накопление нелетучих кислот) или при недостатке оснований.

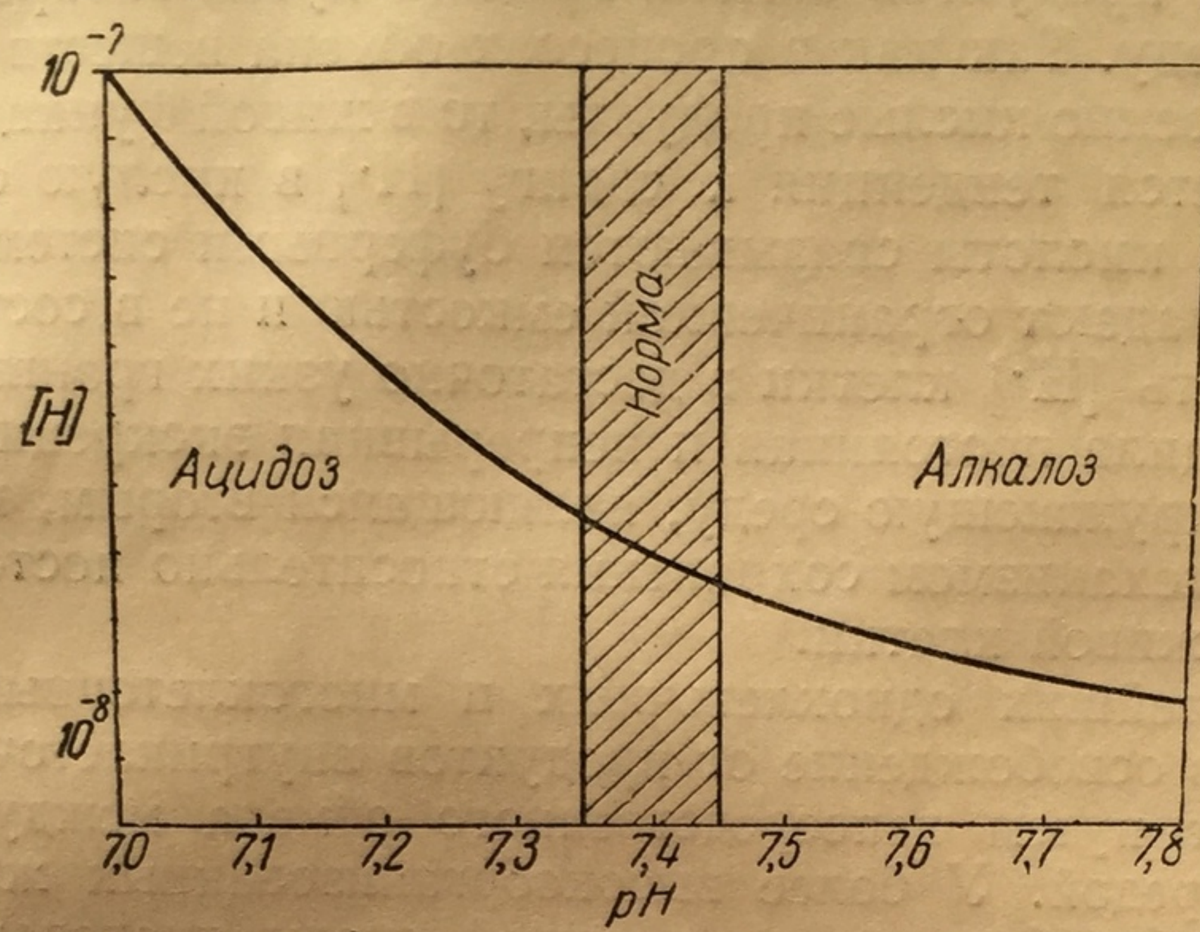


Рис. 2. Прижизненные колебания pH крови.

Пощелочение крови до pH 7,8 (алкалоз) наблюдается при избытке оснований в жидкостях и тканях организма или при недостатке кислот (рис. 2).

Работа 13. **Колориметрическое определение концентрации водородных ионов безбуферным методом**

Для грубого, приближенного определения pH какой-либо жидкости можно воспользоваться любой серией индикаторов, подобранной таким образом, что следующие друг за другом индикаторы имеют последовательно меняющийся интервал изменения окраски. Такая серия индикаторов приведена в табл. 3.

Таблица 3

Серия индикаторов

Название индикатора	Границы pH для переходной окраски индикаторов	Характер изменения окраски	На 10 мл испытуемой жидкости добавляется приблизительно капель
Метилвиолет . . .	0,1—3,2	Зеленая — синяя — фиолетовая	3—8
Диметилгельб . .	2,9—4,0	Красная — желтая . . .	1—2
Метилоранж . . .	3,0—4,4	Красная — желтая . . .	3—5
Метилрот	4,2—6,3	Красная — желтая . . .	2—4
Лакмоид	4,4—6,4	Розовая — синяя	1—4
Нейтральрот . . .	6,8—8,0	Красная — оранжевая .	10—20
Фенолфталеин . .	8,3—10,0	Бесцветная — розовая .	3—20

Прежде чем приступить к определениям при помощи этой серии индикаторов, полезно, прибавляя их к растворам 0,1 н. соляной кислоты и 0,1 н. едкого натра, практически познакомиться с кислыми и щелочными окрасками этих индикаторов.

Пользуясь такой серией индикаторов, определяют приближенно pH дестиллированной и водопроводной воды. Для этого в несколько пробирок с исследуемой водой прибавляют последовательно индикаторы. Так как при этом часть индикаторов дает щелочные окраски, часть — кислые, а для одного или двух получаются окраски, близкие к переходным или переходные окраски, то на основании подобного испытания можно решить, в каком приблизительно интервале лежит pH исследуемой воды.

Для точного колориметрического определения переходят затем к безбуферному определению с рядом Михаэлиса. При этом пользуются уже готовыми сериями окрасок индикаторов, в которых окраска каждой отдельной пробирки отвечает строго определенному pH. Ряд Михаэлиса получают, смешивая различные количества раствора индикатора с подобранным количеством 0,1 н. раствора соды. Получаются, таким образом, ряды пробирок с стандартными растворами различной интенсивности желтого цвета, свойственного растворам взятых индикаторов. Готовый ряд Михаэлиса включает в себя четыре серии пробирок, для приготовления которых служат метанитрофенол, паранитрофенол, γ- и α-динитрофенолы.

Ряд Михаэлиса

I. Метанитрофенол

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH	8,4	8,2	8,0	7,8	7,6	7,4	7,2	7,0	6,8

II. Паранитрофенол

№ пробирки	10	11	12	13	14	15	16	17	18
pH	7,0	6,8	6,6	6,4	6,2	6,0	5,8	5,6	5,4

III. γ- или 2,5-динитрофенол

№ пробирки	19	20	21	22	23	24	25	26
pH	5,4	5,2	5,0	4,8	4,6	4,4	4,2	4,0

IV. α- или 2,4-динитрофенол

№ пробирки	27	28	29	30	31	32	33	34	35
pH	4,4	4,2	4,0	3,8	3,6	3,4	3,2	3,0	2,8

Определение pH с рядом Михаэлиса ведется путем колориметрического сравнения окраски испытуемой жидкости, к которой добавлен один из четырех указанных индикаторов, с окрасками стандартных растворов. Для облегчения колориметрирования можно пользоваться компаратором. Правильные результаты получаются, однако, лишь при соблюдении следующих условий:

1) пробирки, употребляемые для колориметрирования, должны быть бесцветного стекла, одинакового диаметра, хорошо выщелочены паром;

2) сравнение окраски стандартных растворов возможно лишь с окраской испытуемой жидкости, к которой добавлен тот же, что и в данной серии стандартных растворов, индикатор. Например, стандартные пробирки с паранитрофенолом сравниваются лишь с жидкостью, к которой добавлен раствор паранитрофенола;

3) в пробирке с испытуемой жидкостью должна быть определенная, сравнимая с стандартным раствором, концентрация индикатора; поэтому следует брать на 6 мл испытуемой жидкости 1 мл раствора индикатора.

Пользуясь рядом Михаэлиса, определяют pH дистиллированной и водопроводной воды. Для этого к 6 мл исследуемой воды добавляют 1 мл раствора одного из четырех индикаторов, выбор которого делают на основании результатов, полученных при приближенном определении концентрации водородных ионов, откуда известен интервал возможных значений pH. Подбирают затем стандартный раствор, соответствующий по окраске исследуемому, или определяют, между какими стандартными растворами лежит окраска испытуемого раствора.

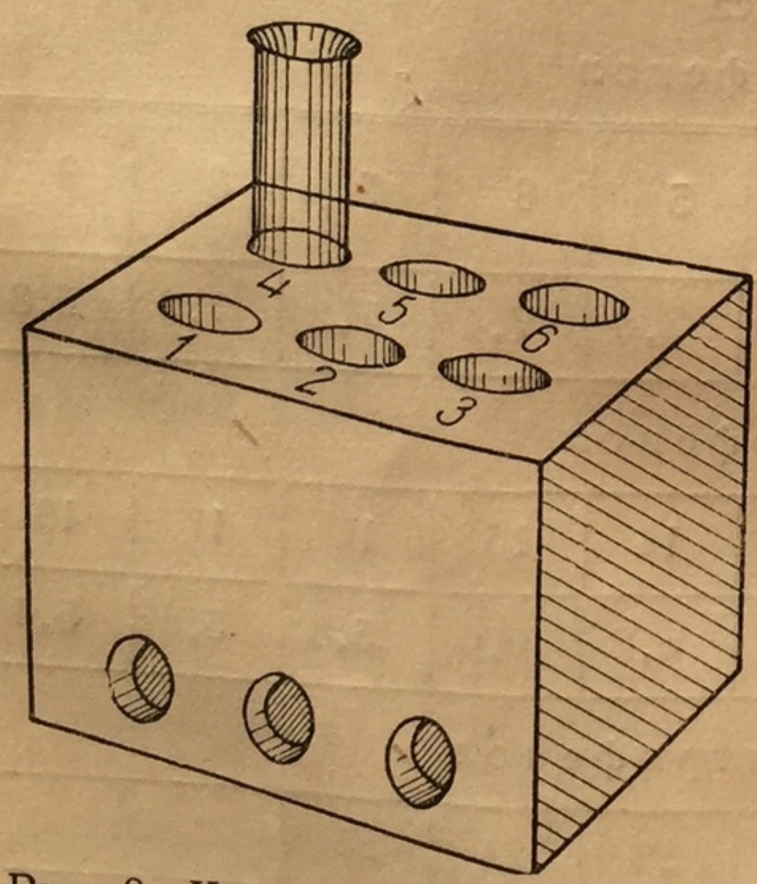


Рис. 3. Компаратор для колориметрического определения pH.

После этого таким же способом определяют pH разбавленных в два-четыре раза слюны и сыворотки крови.

Работа 14. **Колориметрическое определение концентрации водородных ионов окрашенной жидкости**

В большинстве случаев биологические объекты исследования окрашены. Задача безбуферного метода, как и всякого колориметрического метода, несколько осложняется, так как в этих случаях необходимо поставить опыт так, чтобы собственная окраска исследуемой жидкости была исключена. Это достигается следующим образом.

Для определения pH мочи последнюю разбавляют в пять-шесть раз водой и определение ведут с такой разбавленной мочой. В гнезда *1* и *3* компаратора (рис. 3) помещают пробирки с 6 мл мочи и 1 мл воды, а в гнездо *2* — пробирку с дестиллированной водой. Затем к 6 мл мочи добавляют 1 мл раствора индикатора и помещают пробирку в гнездо *5*. Теперь, помещая в гнезда *4* и *6* пробирки с стандартными растворами и сравнивая их окраски в проходящем свете с окраской испытуемой мочи, ведут колориметрирование, как и в предыдущем случае.

Разбавление мочи не препятствует правильному определению, так как при наличии в моче буферных систем свойственная ей [H·] мало изменяется при разведении.

Работа 15. **Приготовление и изучение свойств буферных смесей**

Из многих, предложенных для целей лабораторной техники буферных смесей, пользуются в работах, описанных ниже, фосфатно-цитратными буферными смесями. Смеси эти готовят из соответствующих объемов 0,2 мол. раствора Na_2HPO_4 и 0,1 мол. раствора лимонной кислоты, как это указано в табл. 4.

0,2 мол. раствор Na_2HPO_4 готовят, растворяя 35,628 г $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ в 1000 мл хорошо прокипяченной дестиллированной воды. Двуводный кристаллогидрат получают двухнедельным выветриванием на воздухе обыкновенного $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$.

0,1 мол. раствор лимонной кислоты готовят растворением 21,008 г лимонной кислоты в 1000 мл. воды.

Таблица 4

Цитратно-фосфатные буферные смеси

№ смеси	pH смеси	мл 0,2 мол. раствора Na_2HPO_4	мл 0,1 мол. раствора лимонной кислоты
1	2,2	0,40	19,60
2	2,4	1,24	18,76
3	2,6	2,18	17,82
4	2,8	3,17	16,83
5	3,0	4,11	15,89
6	3,2	4,94	15,06
7	3,4	5,70	14,30
8	3,6	6,44	13,56
9	3,8	7,10	12,90
10	4,0	7,71	12,29
11	4,2	8,28	11,72
12	4,4	8,82	11,18
13	4,6	9,35	10,65
14	4,8	9,86	10,14
15	5,0	10,30	9,70
16	5,2	10,72	9,28
17	5,4	11,15	8,85
18	5,6	11,60	8,40

(*Прод. табл. 4*)

№ смеси	pH смеси	мл 0,2 мол. раствора Na_2HPO_4	мл 0,1 мол. раствора лимонной кислоты
19	5,8	12,09	7,91
20	6,0	12,63	7,37
21	6,2	13,22	6,78
22	6,4	13,85	6,15
23	6,6	14,55	5,45
24	6,8	15,45	4,55
25	7,0	16,47	3,53
26	7,2	17,39	2,61
27	7,4	18,17	1,83
28	7,6	18,73	1,27
29	7,8	19,15	0,85
30	8,0	19,45	0,55

Для изучения свойств буферных смесей готовят смесь № 25. Такая смесь имеет pH 7,0, т. е. примерно ту же концентрацию водородных ионов, что и дестиллированная вода. Добавляют к смеси и к дестиллированной воде две-три капли метилоранжа и затем по каплям 0,1 н. раствор соляной кислоты до розовой окраски. Сравнивают количества пошедшей в том и в другом случае кислоты.

Повторяют опыт, прибавляя к той же смеси и воде фенолфталеин и затем 0,1 н. раствор едкого натра до розовой окраски.

Для того, чтобы резко изменить концентрацию водородных ионов воды, требуется добавление ничтожного количества кислоты или щелочи, в то время как для того, чтобы достигнуть такого же изменения в буферной смеси, необходимо добавление значительного количества кислоты или щелочи.

Готовят затем смесь № 20 и определяют для нее pH с рядом Михаэлиса. После этого разбавляют смесь в десять раз дестиллированной водой и снова определяют pH. Из сравнения этих двух определений можно видеть, насколько изменился pH смеси при разведении. Сравнивают это изменение с изменением pH, происходящим при десятикратном разведении 0,1 н. соляной кислоты.

Из этого опыта можно сделать вывод о сравнительно малом изменении концентрации водородных ионов буферной смеси при разведении ее водой.

Работа 16. **Колориметрическое определение концентрации водородных ионов с помощью буферных смесей**

Исследуя водопроводную воду с серией индикаторов (см. работу 13), находят индикатор, дающий переходную между кислой и щелочной окраску. Затем готовят несколько буферных смесей, pH которых лежит в интервале переходной окраски выбранного

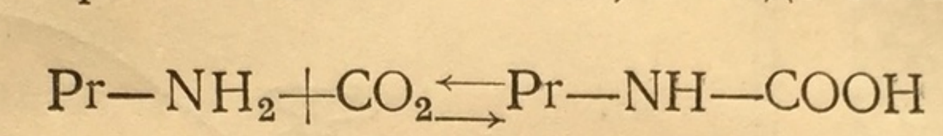
индикатора. Прибавляют к этим смесям и к водопроводной воде равные количества того же индикатора и находят путем колориметрического сравнения буферную смесь, отвечающую по окраске исследуемой воде.

Сравнивают полученный результат с результатом безбуферного определения pH водопроводной воды (работа 13).

Этим же способом с буферными смесями определяют pH мочи. При этом пользуются компаратором и теми указаниями, которые сделаны при описании работы 14. Сравнивают результат определения с результатом, полученным безбуферным методом.

Работа 17. Определение угольной кислоты, связанной в виде бикарбоната в плазме крови

CO_2 в крови находится частью в виде свободной угольной кислоты, частью в виде бикарбонатов Na и K, частью связана с белками, главным образом гемоглобином, в виде остатка карбаминовой кислоты:



$$Pr—NH_2 + CO_2 \rightleftarrows Pr—NH—COOH$$

Относительное значение всех этих форм CO_2 крови видно из табл. 5

Таблица 5

CO_2 крови (в объемных %) при 38°

Форма углекислоты	Венозная кровь		Артериальная кровь	
	плазма	форменные элементы	плазма	форменные элементы
Свободная CO_2	1,8	0,9	1,6	0,8
Связанная в виде бикарбонатов CO_2	35,2	10,5	33,1	9,8
Остальная связанная CO_2 . . .	1,1	2,6	1,0	1,9
Вся CO_2	38,1	14,0	35,7	12,5

Таким образом, наибольшая часть угольной кислоты крови находится там в виде бикарбонатов плазмы.

Так как состав бикарбонатного буфера при pH крови $\cong 7,4$

$$\frac{[BHCO_3]}{[H_2CO_3]} = 20,$$

то бикарбонаты играют главную роль в процессах нейтрализации поступающих в кровь кислот, вследствие чего содержание бикарбонатов крови или плазмы и носит название щелочных резервов.

Состояние бикарбонатного буфера может значительно изменяться, если часть бикарбоната расходуется на нейтрализацию ки-

слот. Такого рода изменения характерны для ацидоза, обусловленного накоплением в крови, при нарушении окислительных процессов в тканях, нелетучих органических кислот, главным образом, ацетоуксусной и β-оксимасляной. В этом случае одним из механизмов нейтрализации накапливающихся в крови кислот, является вытеснение ими углекислоты из бикарбоната. Очевидно, о состоянии бикарбонатного буфера нельзя судить по содержанию в плазме оснований, но только определяя в ней содержание связанной в виде бикарбоната угольной кислоты или так называемой «резервной щелочности».

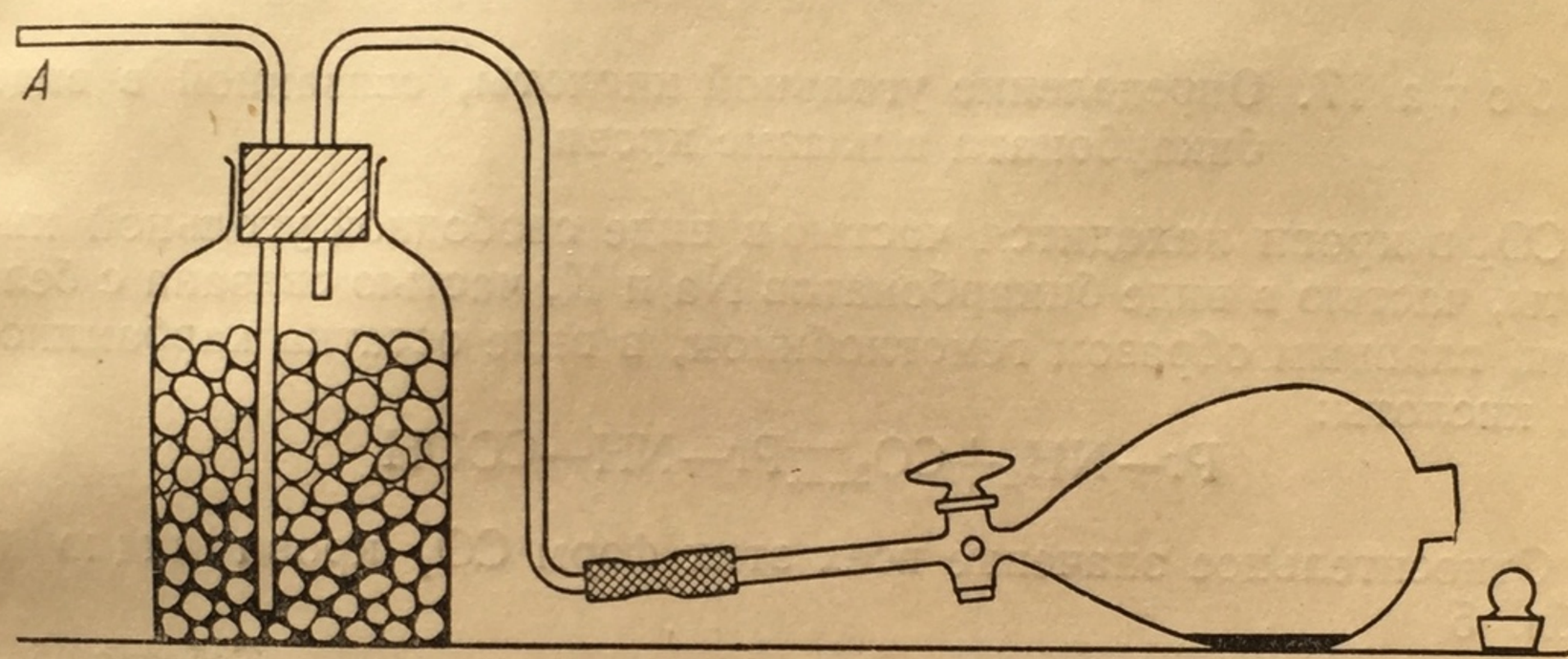


Рис. 4. Прибор для насыщения крови углекислотой.

«Резервная щелочность» плазмы крови, определяемая по методу, описываемому ниже, составляет в норме у человека 55—70 **мл** CO_2 (при 0° и 760 мм), химически связанной в виде бикарбоната в 100 мл плазмы.

5 мл свежеприготовленной оксалатной крови центрифугируют для получения плазмы. 3 мл полученной прозрачной оксалатной плазмы снимают пипеткой и переносят в делительную воронку прибора, изображенного на рисунке 4. Теперь через трубку *A* делают глубокий выдох, причем выдыхаемый воздух, содержащий 5,5% CO_2 (парциальное давление 40 мм), проходит через банку с стеклянными бусами, на которых оседает влага, и наполняет делительную воронку. Закрывают притертую пробку воронки и кран, и отъединяют воронку. Некоторое время вращают воронку для скорейшего достижения равновесия между CO_2 в введенном в воронку воздухе и в плазме. Таким образом, получают плазму, насыщенную CO_2 при определенных условиях, близких к тем, которые имеют место в организме, и эту плазму используют для дальнейшего определения.

Поднимая грушу аппарата, изображенного на рис. 5, заполняют измерительную трубку и просвет верхнего двухходового крана, соединяющий измерительную трубку с воронкой, ртутью. После этого в воронку прибора вносят 0,5 мл воды, не содержа-

щей CO_2 и затем с помощью микропипетки под слой воды вносят 1,0 мл приготовленной для исследования плазмы. Опускают грушу прибора и поворотом верхнего крана переводят почти всю жидкость из воронки в прибор. Затем в воронку помещают 0,5 мл воды и маленькую каплю октилового или амилового алкоголя и также вводят в прибор, после чего таким же образом через воронку в прибор вводят 0,5 мл 10 %-ной H_2SO_4. Теперь, при хорошо закрытом верхнем кране, опускают грушу так, чтобы ртуть в приборе опустилась до нижнего крана, но введенная в прибор смесь оставалась выше нижнего крана. Нижний кран закрывают и прибор сильно встряхивают или несколько раз опрокидывают. Этим достигается полное выделение CO_2 из жидкости, находящейся в приборе под вакуумом.

После этого нижний кран поворачивают так, чтобы главный резервуар прибора соединился с нижним расширенным каналом *B*, и переводят туда всю жидкость из прибора. Затем нижний кран повертывают так, чтобы главный резервуар соединялся с другим нерасширенным нижним каналом *A* и поднимают грушу прибора до тех пор, пока ртуть в груше и в приборе (измерительной трубке) не окажется на одном уровне. После этого отсчитывают объем CO_2 в трубке и одновременно отмечают температуру и барометрическое давление.

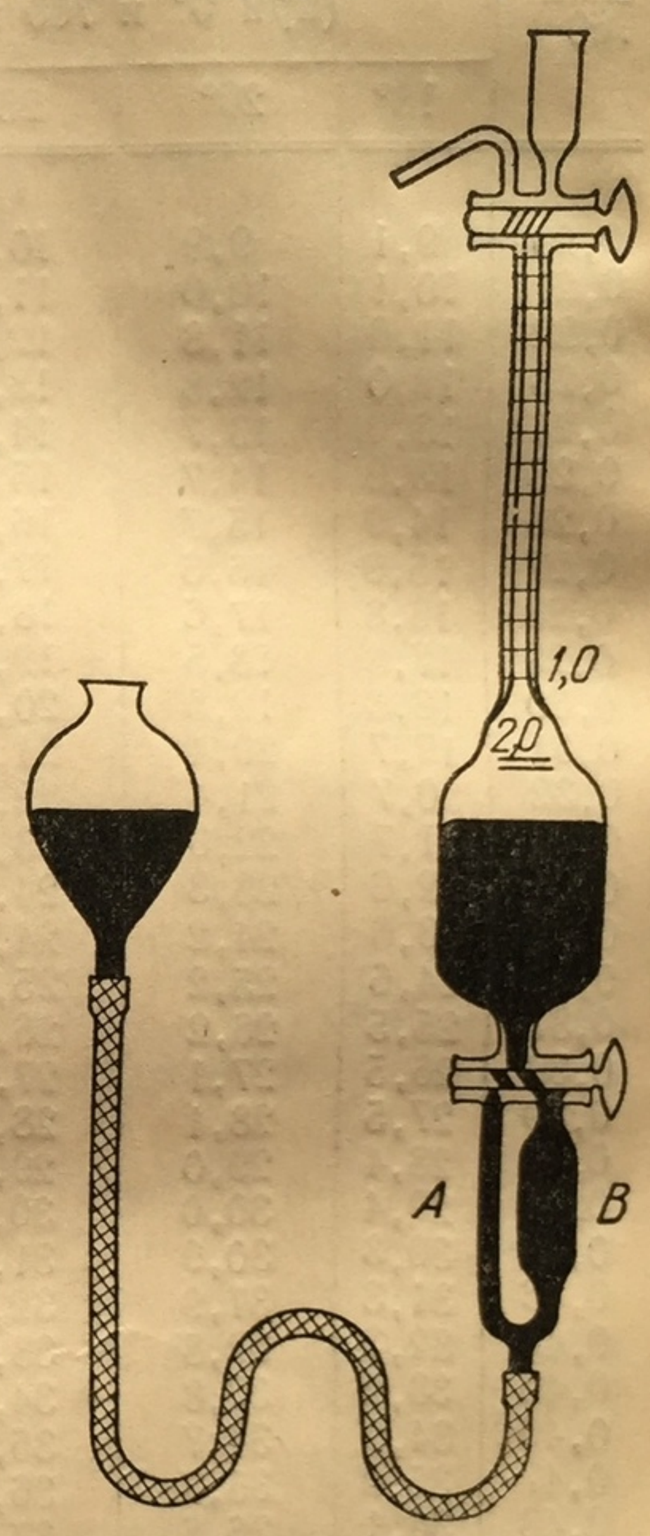


Рис. 5. Прибор для определения резервной щелочности

Открыв теперь верхний кран на соединение с отводной трубкой, опускают грушу прибора до тех пор, пока ртуть не достигнет нижнего крана, тогда последний поворачивают на соединение расширенного, наполненного отработанным раствором, канала *B* с прибором и, поднимая грушу, выталкивают всю эту жидкость из прибора, после чего верхний кран закрывается. Теперь прибор готов для следующего определения.

Зная атмосферное давление *P* в момент опыта, найденный объем CO_2—V приводят к объему при 760 мм давления: $V_0 = \frac{V \cdot P}{760}$, а по объему V_0, пользуясь готовой таблицей Ван-Слайка (табл. 6), находят для данной температуры соответствующий объем CO_2 (в см³ при 0° и 760 мм), который связан в 100 мг плазмы крови в виде бикарбоната. При вычислении цифр этой таблицы сделана поправка

на угольную кислоту, находящуюся в исследуемой плазме в растворенном состоянии, а не в виде бикарбоната.

Таблица 6

Таблица для определения в плазме связанной в виде бикарбоната CO_2 (резервной щелочности)

$\frac{V \cdot P}{760}$	100 мл плазмы связывают в виде бикарбоната см³ CO_2 (при 0° и 760 мм)				$\frac{V \cdot P}{760}$	100 мл плазмы связывают в виде бикарбоната см³ CO_2 (при 0° и 760 мм)			
	15°	20°	25°	30°		15°	20°	25°	30°
0,20	9,1	9,9	10,7	11,8	0,60	47,7	48,1	48,5	48,6
0,21	10,1	10,0	11,7	12,6	0,61	48,7	49,0	49,4	49,5
0,22	11,0	11,8	12,6	13,5	0,62	49,7	50,0	50,4	50,4
0,23	12,0	12,8	13,6	14,3	0,63	50,7	51,0	51,3	51,4
0,24	13,0	13,7	14,5	15,2	0,64	51,6	51,9	52,2	52,3
0,25	13,9	14,7	15,5	16,1	0,65	52,6	52,8	53,2	53,2
0,26	14,9	15,7	16,4	17,0	0,66	53,6	53,8	54,1	54,1
0,27	15,9	16,6	17,4	18,0	0,67	54,5	54,8	55,1	55,1
0,28	16,8	17,6	18,3	18,9	0,68	55,5	55,7	56,0	56,0
0,29	17,8	18,5	19,2	19,8	0,69	56,5	56,7	57,0	56,9
0,30	18,8	19,5	20,2	20,8	0,70	57,4	57,6	57,9	57,9
0,31	19,7	20,4	21,1	21,7	0,71	58,4	58,6	58,9	58,8
0,32	20,7	21,4	22,1	22,6	0,72	59,4	59,5	59,8	59,7
0,33	21,7	22,3	23,0	23,5	0,73	60,3	60,5	60,7	60,7
0,34	22,6	23,3	24,0	24,5	0,74	61,3	61,4	61,7	61,6
0,35	23,6	24,2	24,9	25,4	0,75	62,3	62,4	62,6	62,5
0,36	24,6	25,2	25,8	26,3	0,76	63,2	63,3	63,6	63,4
0,37	25,5	26,2	26,8	27,3	0,77	64,2	64,3	64,5	64,3
0,38	26,5	27,1	27,7	28,2	0,78	65,2	65,3	65,5	65,3
0,39	27,5	28,1	28,7	29,1	0,79	66,1	66,2	66,4	66,2
0,40	28,4	29,0	29,6	30,0	0,80	67,1	67,2	67,3	67,1
0,41	29,4	30,0	30,5	31,0	0,81	68,1	68,1	68,3	68,0
0,42	30,3	30,9	31,5	31,9	0,82	69,0	69,1	69,2	69,0
0,43	31,3	31,9	32,4	32,8	0,83	70,0	70,0	70,2	69,9
0,44	32,3	32,8	33,4	33,8	0,84	71,0	71,0	71,1	70,8
0,45	33,2	33,8	34,3	34,7	0,85	71,9	72,0	72,1	71,8
0,46	34,2	34,7	35,3	35,6	0,86	72,9	72,9	73,0	72,7
0,47	35,2	35,7	36,2	36,5	0,87	73,9	73,9	74,0	73,6
0,48	36,1	36,6	37,2	37,4	0,88	74,8	74,8	74,9	74,5
0,49	37,1	37,6	38,1	38,4	0,89	75,8	75,8	75,8	75,4
0,50	38,1	38,5	39,0	39,3	0,90	76,8	76,7	76,8	76,4
0,51	39,1	39,5	40,0	40,3	0,91	77,8	77,7	77,7	77,3
0,52	40,0	40,4	40,9	41,2	0,92	78,7	78,6	78,7	78,2
0,53	41,0	41,4	41,9	42,1	0,93	79,7	79,6	79,6	79,2
0,54	42,0	42,4	42,8	43,0	0,94	80,7	80,5	80,6	80,1
0,55	42,9	43,3	43,8	43,9	0,95	81,6	81,5	81,5	81,0
0,56	43,9	44,3	44,7	44,9	0,96	82,6	82,5	82,4	82,0
0,57	44,9	45,3	45,7	45,8	0,97	83,6	83,4	83,4	82,9
0,58	45,8	46,2	46,6	46,7	0,98	84,5	84,4	84,3	83,8
0,59	46,8	47,1	47,5	47,6	0,99	85,5	85,3	85,2	84,8
0,60	47,7	48,1	48,5	48,6	1,00	86,5	86,2	86,2	85,7

Ферментами
тех разнообра
которых лежит
низма. Таким о
кающих в жив
изучение как о
является одной
действие впер
в 1811 г.

Так как по
тализаторами,
динамически
лизатора) закл
реакций, котор
ничтожно мал
ции при участ
жуточного соед
ществом) и
чего достигае
реакции. Таки
циональна ко
как фермент
реакции, т. е.
тельно, выходи
но малых коли
больших коли

Ферменты,
рость, с котор
ции, но не в

ГЛАВА III

ФЕРМЕНТЫ

> «Где есть белки, а они образуют основу того вещества, которое мы называем протоплазмой, мы имеем не только материал — самое сложное органическое вещество, но и орудие — фермент, обусловливающее возможность бесконечного ряда продуктов его распадения и их обратного синтеза. В комке белкового вещества потенциально дан весь разнообразный химизм живого тела».
>
> *К. А. Тимирязев.*

Ферментами, или энзимами, называются биокатализаторы тех разнообразных реакций обмена веществ, совокупность которых лежит в основе жизнедеятельности всякого организма. Таким образом, большинство химических реакций, протекающих в живом организме, ускоряется ферментами, а поэтому изучение как самих ферментов, так и ферментативных реакций является одной из важнейших задач биохимии. Ферментативное действие впервые было открыто русским академиком Кирхгофом в 1811 г.

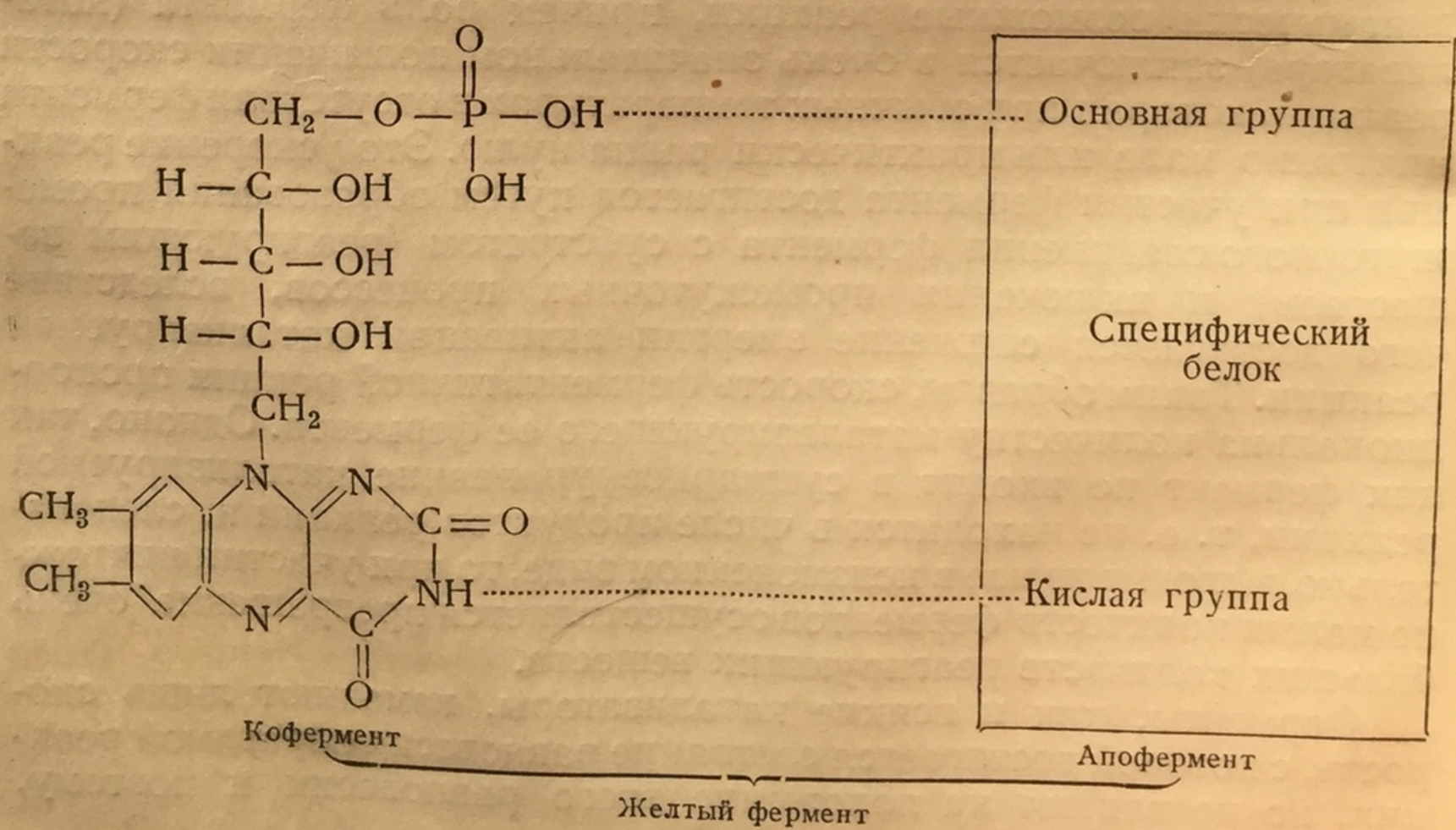
Так как по характеру своего действия ферменты являются катализаторами, то при их участии осуществляются только термодинамически возможные реакции, причем роль фермента (катализатора) заключается в очень значительном повышении скорости реакций, которая при обычных температурах в отсутствии фермента ничтожно мала или практически равна нулю. Это ускорение реакции при участии фермента достигается путем образования промежуточного соединения фермента с субстратом (реагирующим веществом) и включения промежуточных процессов, вследствие чего достигается снижение энергии активации катализируемой реакции. Таким образом, скорость ферментативной рекции пропорциональна количеству катализирующего ее фермента. Однако, так как фермент не входит в суммарное уравнение катализируемой реакции, т. е. не находится в числе продуктов реакции и, следовательно, выходит из нее в неизмененном виде, то при участии ничтожно малых количеств ферментов осуществляется превращение очень больших количеств реагирующих веществ.

Ферменты, как и всякие катализаторы, изменяют лишь скорость, с которой достигается состояние равновесия обратимой реакции, но не влияют на положение этого равновесия и поэтому,

в зависимости от соотношения реагирующих веществ, один и тот же фермент ускоряет как прямую, так и обратную реакцию.

По своей химической природе ферменты — белковые вещества, обладающие высоким молекулярным весом от 15 600—483 000 и коллоидными свойствами. Они находятся в очень малых количествах во всех живых клетках и жидкостях организма; при этом в различных клетках могут содержаться различные ферменты. Многие ферменты сравнительно легко растворимы в воде, водном алкоголе, ацетоне и глицерине, солевых растворах и поэтому без затруднений могут быть извлечены из клеток, другие — прочно связаны с элементами клеточной структуры и могут быть извлечены в раствор только после механического разрушения или автолитического расщепления клеток. Незначительное содержание ферментов в жидкостях и тканях организма и наличие большого числа сопутствующих белковых веществ делает задачу выделения ферментов в чистом состоянии очень трудной, однако, многие из ферментов получены в достаточно высоко очищенном состоянии в виде белковых микрокристаллов. Хотя эти кристаллы во многих случаях содержат значительную примесь неорганических солей, а иногда и сопутствующих инертных белков, однако, получение их указывает на высокую степень очистки фермента от посторонних веществ.

Для многих ферментов, получивших название ферментов-протеидов, установлено наличие двух компонентов, составляющих активную форму фермента,— белкового вещества (апофермента) и простетической или активной группы (кофермента) — вещества небелкового характера или, в некоторых случаях, атома тяжелого металла (некоторые оксидазы, например, являются Cu-протеидами). При этом у одних ферментов эти компоненты прочно между собою связаны, у других же — связь эта непрочна и фермент в растворе находится в значительной части в диссоциированном со-

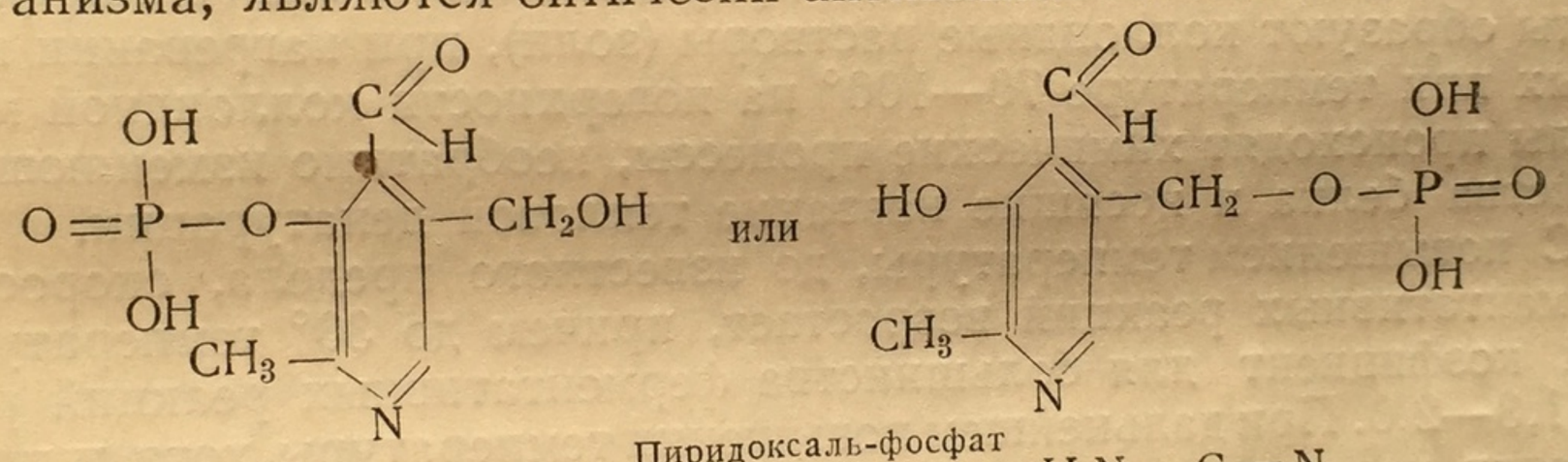


стоянии в виде кофермента и апофермента, причем кофермент в противоположность апоферменту диффундирует через полупроницаемые мембраны и термостабилен.

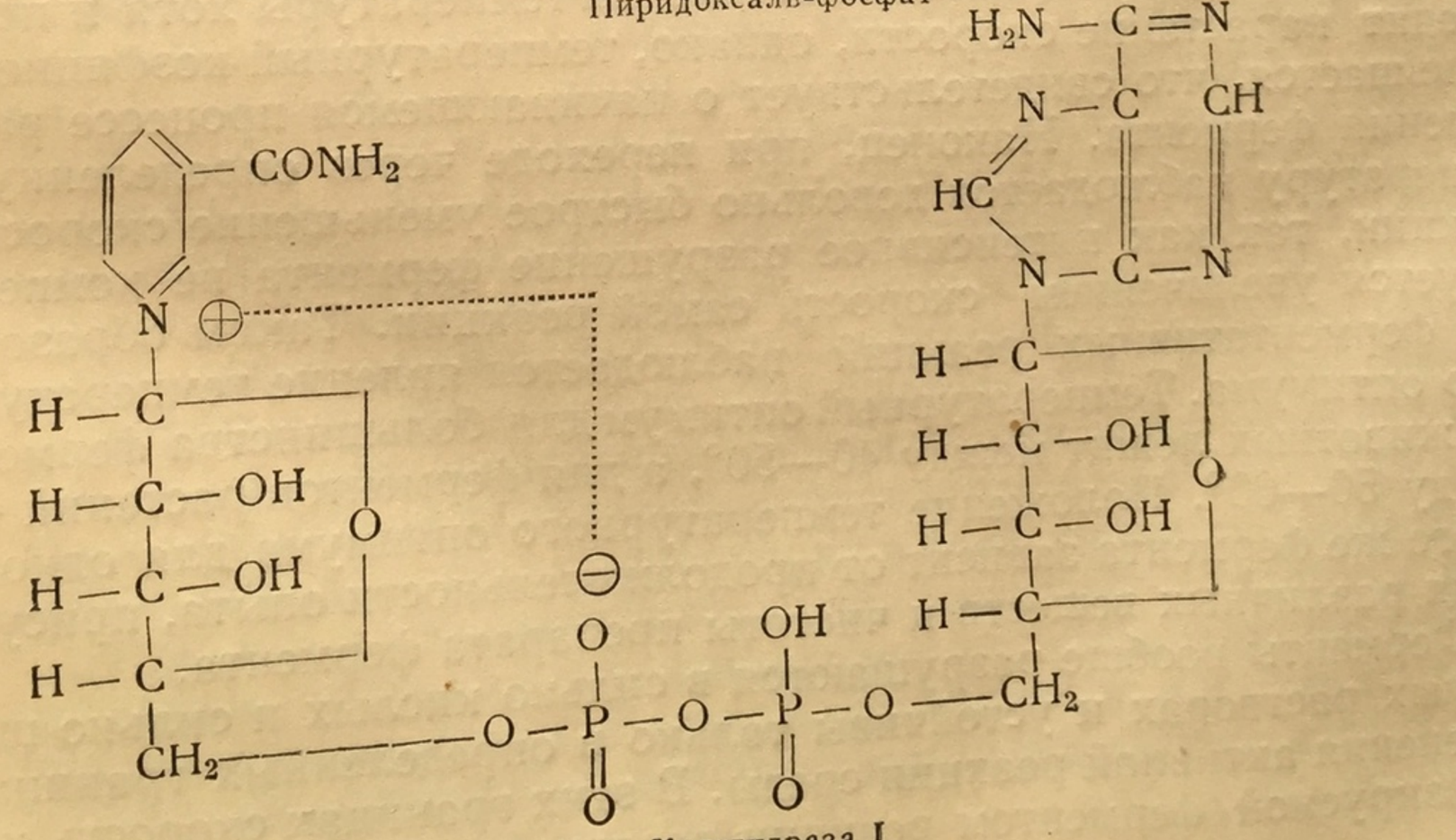
Примерами таких диссоциирующих двухкомпонентных ферментных систем могут служить фосфорилаза животных тканей (кофермент—адениловая кислота), дегидраза глутаминовой кислоты (кофермент—кодегидраза II) и желтый фермент (кофермент — фосфорный эфир рибофлавина).

В ряде случаев один и тот же кофермент может входить в состав нескольких ферментов с различной специфичностью к субстрату и, следовательно, апофермент является частью, определяющей не только высокую каталитическую активность, но и специфичность полной ферментной системы. Примерами таких коферментов служат кодегидраза I, образующая с соответствующими специфическими апоферментами лактикодегидразу, маликодегидразу, алкогольдегидразу и другие ферментные системы и фосфорный эфир пиридоксаля, являющийся коферментом декарбоксилазы аминокислот и трансаминазы.

Ферменты, как и все белковые вещества, имеют асимметрическое строение, чем обусловлена стереохимическая специфичность их действия. В связи с этой особенностью ферментов и катализируемых ими реакций находится то общее явление, что основные биогенные соединения, входящие в состав живой клетки и живого организма, являются оптически активными веществами.



Пиридоксаль-фосфат



Кодегидраза I

Многие отрасли промышленности, как, например, виноделие, получение спирта брожением, хлебопечение, производство сыра, построены на применении ферментов. В области разработки вопросов технической биохимии очень много сделано акад. А. И. Опариным и его учениками.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

По сравнению с простейшими катализаторами для ферментов характерна высокая специфичность их действия, которая, однако, различно выражена у различных ферментов. Наряду с ферментами высокоспецифичными, например, такими, как глюкозидазы, ускоряющие гидролиз только определенных дисахаридов, или такими, как уреаза, ускоряющая расщепление только мочевины, имеются и ферменты менее строго специфичные, как, например, протеазы, ускоряющие гидролиз целого ряда соединений, построенных по общему типу, начиная от некоторых простейших дипептидов и кончая высокомолекулярными белковыми веществами.

Другой особенностью почти всех ферментов является их термолабильность, т. е. склонность быстро и необратимо терять в растворах свою активность при сравнительно непродолжительном нагревании до 80—100°. Это свойство может служить для отличия ферментов от обычных катализаторов. Термолабильность ферментов связана с их белковой природой. Как и все белки, ферменты образуют коллоидные растворы (золи), при нагревании которых при температуре 70—100° на поверхности коллоидной мицеллы происходят химические процессы, необратимо изменяющие свойства белка и носящие название тепловой денатурации.

С повышением температуры, до известного предела, скорость ферментативных реакций возрастает, причем до 30° температурный коэфициент для большинства ферментативных реакций равен 1,3—2,0. При дальнейшем повышении температуры хотя и происходит нарастание скорости, однако, температурный коэфициент уменьшается, что свидетельствует о начинающемся процессе разрушения фермента. Наконец, при переходе через определенную температуру наблюдается довольно быстрое уменьшение скорости реакции, так как интенсивное разрушение фермента не компенсируется увеличением скорости самой реакции. Таким образом, для ферментативных реакций наблюдается явление температурного оптимума. Температурный оптимум для большинства ферментов животных лежит между 40—50°, а для ферментов растений — между 50—60°. Положение температурного оптимума для одного и того же фермента зависит от продолжительности опыта, присутствия различных веществ и чистоты препарата фермента.

Ферменты вообще разрушаются в сильно кислых и сильно щелочных растворах и устойчивы только в определенных границах изменения активной реакции среды. В этих границах скорость катализируемой ферментом реакции различна при различных [H·],

причем только при определенной [H·] наблюдается наибольшая скорость реакции. Такая оптимальная [H·] отвечает наибольшей активности фермента. Оптимальная [H·] не всегда одинакова для различных препаратов одного и того же фермента и изменяется иногда в зависимости от степени чистоты фермента. Кроме того, оптимальные [H·] двух ферментативных реакций с различными субстратами, но катализируемых одним и тем же ферментом, могут быть несколько отличными.

Скорость ферментативной реакции, т. е. количество субстрата, прореагировавшее в единицу времени, находится в зависимости от количества субстрата, количества фермента и ряда других факторов (температуры, [H·], присутствия продуктов ферментативной реакции, активаторов и ингибиторов, степени чистоты ферментного препарата). При малых количествах субстрата скорость возрастает примерно пропорционально количеству последнего; при избыточных количествах субстрата — постепенно падает. При оптимальных или избыточных количествах субстрата скорость ферментативной реакции обычно прямо пропорциональна количеству фермента и, следовательно, скорость реакции возрастает вдвое при увеличении в два раза количества фермента. Однако в присутствии некоторых веществ скорость ферментативной реакции, при прочих равных условиях, может быть различной с одним и тем же количеством фермента. Такие вещества или увеличивают активность фермента (активаторы), или уменьшают (ингибиторы).

Механизм такого активирующего и угнетающего действия может быть различным. Некоторые вещества могут вступать в химическое взаимодействие с активной группой фермента, причем последний теряет свою активность. Другие изменяют белковую часть фермента или связь его с активной группой как в сторону увеличения активности, так и в сторону уменьшения, до полной потери ее ферментом. Кроме таких активаторов и ингибиторов могут быть вещества, присутствие которых, не изменяя активности фермента, влияет на состояние самой катализируемой реакции.

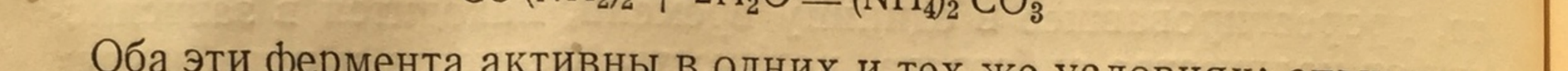
К числу активаторов и парализаторов можно отнести также и различные окислители и восстановители. Эти вещества могут или необратимо разрушать фермент, или своим присутствием создавать определенное окислительно-восстановительное состояние среды, (выражаемое величиной окислительно-восстановительного потенциала Eh), которое отражается на активности фермента. Так, например, активность уреазы является функцией Eh, причем оптимальная активность наблюдается при $Eh = +150V$ и постепенно падает при более низких и более высоких значениях Eh.

Некоторые ферменты находятся в клетках и тканях в виде неактивных проферментов (зимогенов), приобретающих ферментативную активность лишь после взаимодействия с специфическими или неспецифическими активаторами, в результате чего образуется активная форма фермента.

Работа 18. **Специфичность ферментативного действия**

В слюне человека находится фермент амилаза, ускоряющий гидролиз глюкозидных связей молекулы крахмала с образованием декстринов и мальтозы, которые, в противоположность крахмалу, не дают синей окраски с иодом.

В бобах сои и во многих других растениях содержится фермент уреаза, ускоряющий гидролиз диамида угольной кислоты — мочевины.



$$CO(NH_2)_2 + 2H_2O = (NH_4)_2CO_3$$

Оба эти фермента активны в одних и тех же условиях; оптимум действия амилазы слюны pH =6,8, оптимум для уреазы pH =7,0.

В две пробирки (№ 1 и 2) наливают по 5 мл 0,1%-ного раствора крахмала, предварительно убедившись, что при добавлении к такому раствору одной-двух капель раствора J в KJ получается синее окрашивание. Затем в две другие пробирки (№ 3 и 4) наливают по 5 мл 1% раствора мочевины, к которому добавлено несколько капель фенолфталеина. После этого в пробирки № 1 и 3 вносят по 1 мл профильтрованной слюны (можно пользоваться слюной, предварительно разбавленной водой), а в пробирки № 2 и 4 по 1 мл раствора уреазы (см. работу 28) и ставят в водяной термостат при 38—40° на 10—25 минут. По окончании нагревания в пробирки № 1 и 2 добавляют по одной капле раствора иода в иодистом калии.

Гидролитическое расщепление крахмала (исчезновение синей окраски с иодом) происходит только в присутствии амилазы (пробирка № 1), а расщепление мочевины (появление розового окрашивания фенолфталеина) только в присутствии уреазы (пробирка № 3).

Работа 19. **Термолабильность ферментов и влияние [H·] на ферментативные реакции**

Берут три пробирки и наливают в каждую по 5 мл 0,1%-ного раствора крахмала. Затем в первую и вторую прибавляют по 1 мл дестиллированной воды, а в третью —1 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты. После этого в первую и третью пробирки прибавляют по 1 мл профильтрованной слюны (можно пользоваться слюной, разбавленной в несколько раз водой), а во вторую —1 мл той же слюны, но предварительно прокипяченной и охлажденной. Все три пробирки ставят на 20—25 минут в термостат при 37°. Вынув пробирки из термостата, их охлаждают, погружая в ледяную воду и доливая холодной водой, а затем в каждую добавляют по одной-две капли раствора иода в иодистом калии.

Только в первой пробирке происходит расщепление крахмала (синего окрашивания при добавлении раствора J в KJ не наблюдается). Во второй пробирке фермент необратимо инактивирован нагреванием, а в третьей — реакция протекает слишком медленно вследствие высокой кислотности раствора (оптимум действия ами-

лазы слюны pH = 6,8). Поэтому во второй и третьей пробирках получается синее окрашивание с раствором J в KJ.

Работа 20. **Влияние температуры на скорость ферментативной реакции**

Берут четыре пробирки и помещают в каждую по 5 мл 0,25%-ного раствора крахмала. Затем пробирку № 1 помещают в ледяную воду, пробирки № 2 и 3 в термостат при 38° и пробирку № 4 в хорошо кипящую водяную баню. После этого, по возможности одновременно, вносят в пробирки № 1, 2 и 4 по 0,5 мл слюны, а в пробирку № 3—0,5 мл прокипяченной слюны. Время от времени из пробирки № 2 берут каплю и вносят в 1 мл сильно разбавленного раствора J в KJ. Когда такая капля перестает давать окрашивание и, следовательно, в пробирке № 2 расщепление крахмала закончилось, во все пробирки добавляют 3—4 мл 1,0 н. H_2SO_4 и охлаждают. Затем добавляют во все пробирки по две-три капли раствора иода в иодистом калии. Только в пробирке № 2, нагревавшейся при температуре, близкой к оптимальной, расщепление крахмала оказывается законченным (нет окрашивания с иодом). В пробирке № 3 расщепления крахмала нет, так как фермент предварительно инактивирован нагреванием.

Работа 21. **Зависимость скорости ферментативной реакции от количества фермента**

Берут четыре пробирки и наливают в каждую по 3 мл фосфатно-цитратной буферной смеси с pH=6,8 (№ 24). Затем в каждую пробирку помещают по 4 мл 0,25% раствора крахмала и добавляют, по возможности одновременно, в первую пробирку 1 мл слюны, разведенной в 20 раз, во вторую — 1 мл слюны, разведенной в 40 раз, в третью —1 мл слюны, разведенной в 80 раз и в четвертую — 1 мл слюны, разведенной в 160 раз. Тотчас помещают пробирки в термостат при температуре 38—40°, а затем время от времени отбирают пробы в количестве нескольких капель и смешивают в отдельных пробирках с сильно разбавленным раствором J в KJ. Вначале пробы дают синее, а затем красно-фиолетовое и красное окрашивание. Отмечают с точностью до 0,5 минуты время от начала опыта до исчезновения синего окрашивания с иодом для каждой из четырех пробирок. Этот момент считают концом амилокластического расщепления.

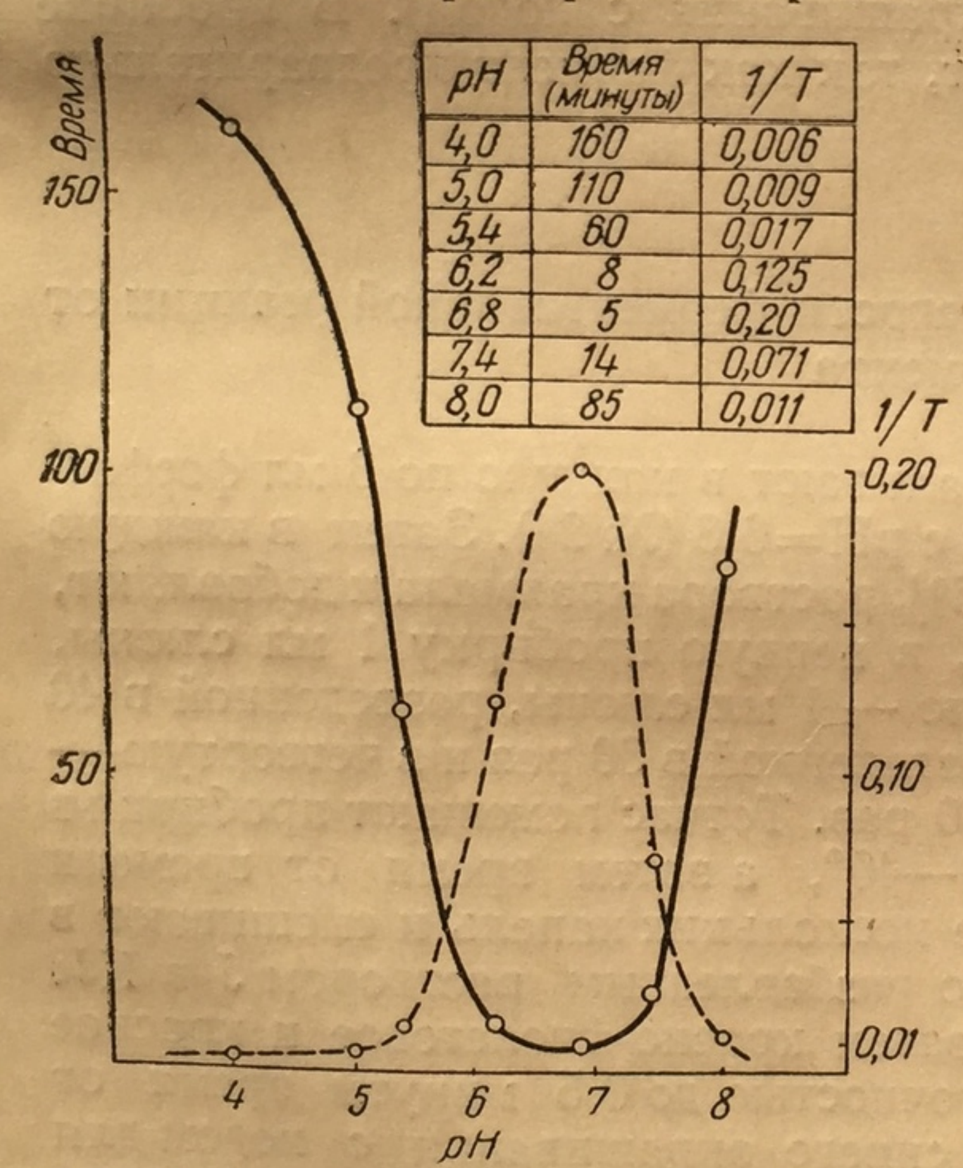
Результаты опыта изображают графически, откладывая по оси абсцисс относительную концентрацию амилазы, а по оси ординат соответствующее время. Время, потребное для расщепления крахмала, обратно пропорционально скорости реакции.

Работа 22. Определение [H·] оптимальной для амилокластической активности амилазы слюны

Берут семь пробирок и наливают в каждую по 5 мл цитратно-фосфатной буферной смеси (см. работу 15) следующим образом:

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7
№ смеси	10	15	17	21	24	27	30
pH	4,0	5,0	5,4	6,2	6,8	7,4	8,0

Затем в каждую пробирку наливают по 4 мл 0,25%-ного раствора крахмала и, наконец, по 1 мл разведенной слюны. Тотчас помещают все пробирки в термостат при температуре 38°. Время от времени отбирают от всех пробирок пробы в количестве нескольких капель и смешивают в отдельных пробирках с сильно разбавленным раствором J в KJ. Вначале пробы дают синее окрашивание, а по прошествии некоторого времени красно-фиолетовое или красное окрашивание и, наконец, перестают давать окраску с иодом.



pH	Время (минуты)	1/T
4,0	160	0,006
5,0	110	0,009
5,4	60	0,017
6,2	8	0,125
6,8	5	0,20
7,4	14	0,071
8,0	85	0,011

Рис. 6. Кривая зависимости активности амилазы от pH.

Отмечают для каждой из пяти пробирок время (с точностью до 0,5 минуты), когда проба перестает давать синее окрашивание. Этот момент можно считать концом амилокластического расщепления. Полученные результаты изображают графически. Для этого по оси абсцисс наносят pH опытов, а по оси ординат — соответствующее время расщепления крахмала. Нанесенные точки соединяют кривой (см. рис. 6). Опыт, в котором расщепление произошло в наиболее короткий срок, соответствует максимальной активности фермента, а pH этого опыта — оптимальной [H·].

Работа 23. **Влияние хлористого натрия и фенилтиомочевины (активаторов) на амилокластическую активность амилазы слюны**

В три пробирки наливают по 2 мл 0,25—0,5% раствора крахмала и по 4 мл буферной смеси с pH =6,8 (№ 24). Затем в первую пробирку наливают 3 мл воды, во вторую 3 мл 0,1%-ного раствора хлористого натрия, а в третью —3 мл 0,02%-ного раствора фенилтиомочевины. После этого в каждую пробирку добавляют по 1 мл разведенной слюны и тотчас ставят пробирки в термостат (температура 38°). Время от времени берут пробы и отмечают для каждой пробирки время, необходимое для исчезновения (в пробе) синего окрашивания с раствором J в KJ. Сравнивая время расщепления крахмала во второй и третьей пробирках с временем расщепления в первой пробирке (контроль), вычисляют соответствующее ускорение в минутах.

ОТДЕЛЬНЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ ФЕРМЕНТОВ И ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Так как ферменты представляют главный интерес со стороны их каталитической функции и изучаются в связи с катализируемыми ими реакциями, то номенклатура и классификация ферментов основаны на признаках, характерных для соответствующих ферментативных реакций или для веществ, испытывающих превращение в том или ином ферментативном процессе. Такой принцип, при дополнительном условии добавления для наименования фермента окончания «аза», дает простой способ к обозначению любого, даже еще очень мало и поверхностно изученного фермента. Однако, этот универсальный способ номенклатуры имеет и свои недостатки, так как может приводить в отдельных случаях к ошибочным определениям, когда для одного и того же фермента могут быть даны различные наименования или, наоборот, различные ферменты могут получить одно название. Такого рода неясности и ошибки в номенклатуре ферментов устраняются при более глубоком изучении как самого фермента, так и механизма катализируемой им реакции. Поэтому только выделение фермента в очищенном состоянии и подробное изучение его химических и физико-химических свойств, строения и функции его активной группы, условий и механизма самой ферментативной реакции могут служить достаточно надежными основаниями для его характеристики.

Следуя указанному выше принципу, можно различать следующие основные группы известных ферментов:

1. Гидролазы — ферменты, ускоряющие реакции гидролиза различных соединений. Ферменты этой группы по специфичности своего действия подразделяются на карбогидразы, ускоряющие гидролиз глюкозидных связей ди- и полисахаридов и глюкозидов; эстеразы, катализирующие гидролиз сложных

эфиров фосфорной, серной и карбоновых кислот; амидазы, — ускоряющие гидролиз амидов кислот, и пептидазы (полипептидазы и протеазы), ускоряющие гидролиз пептидных связей дипептидов, полипептидов и белков.

2. Фосфорилазы — ферменты, катализирующие реакции фосфоролиза глюкозидных и N-глюкозидных связей.

3. Фосфоферазы (трансфосфорилазы) — ферменты, ускоряющие реакции переноса остатка фосфорной кислоты между двумя различными молекулами.

4. Фосфомутазы — ферменты, катализирующие реакции переноса остатка фосфорной кислоты от одной части молекулы к другой.

5. Мутазы — ферменты, катализирующие реакции окислительно-восстановительных дисмутаций.

6. Изомеразы (фосфоизомеразы) — ферменты, ускоряющие процессы изомерных превращений окислительно-восстановительного характера.

7. Различные ферменты, катализирующие реакции присоединения к непредельным связям.

8. Десмолазы — ферменты, ускоряющие реакции, идущие с разрывом (или образованием) связи между углеродными атомами.

9. Различные ферменты, катализирующие реакции переноса водорода от окисляемого субстрата на какой-либо акцептор и в том числе на кислород и перекись водорода. Эта группа включает большое число разнообразных по своему действию ферментов, носящих часто общее название окислительно-восстановительных ферментов.

Процесс биологического окисления за счет переноса водорода с участием дегидраз был открыт акад. В. И. Палладиным, который высказал также мысль о значении полифенолов в окислительно-восстановительной системе живой клетки. Правильность идеи В. И. Палладина была экспериментально подтверждена акад. А. И. Опариным. Основоположник советской биохимии акад. А. Н. Бах впервые указал на значение образования перекисных соединений при различных случаях окисления ненасыщенных соединений. Акад. А. Н. Бах разработал известную перекисную теорию биологического окисления с участием перекиси и фермента пероксидазы, которая была им впервые получена в очищенном состоянии. В теориях акад. А. Н. Баха и акад. В. И. Палладина заключены основные мысли, развитые далее при изучении процессов биологического окисления в живой клетке.

По характеру катализируемой окислительно-восстановительной реакции отличают различные дегидразы, ферменты, катализирующие реакции окислительного дезаминирования и переаминирования, разнообразные оксидазы, пероксидазы и каталазы. Для характеристики отдельных групп окислительно-восстановительных ферментов прибегают также и к подразделению на осно-

вании известных особенностей в строении и свойствах их активной группы. Так, отличают ферменты, представляющие Cu-протеиды, ферменты, содержащие Fe-порфириновый комплекс и т. п.

Приведенный перечень хотя и не охватывает всех без исключения известных ферментов, однако, дает представление о разнообразии типов биокатализаторов. Число различных индивидуальных ферментов, повидимому, еще значительнее, так как ферменты даже тождественные или мало отличающиеся по своему действию, но различные по своему биологическому происхождению, часто неидентичны. Это может зависеть как от наличия сопутствующих ферменту веществ, так может быть и проявлением видовой специфичности. Поэтому при названии фермента часто указывается источник, из которого он получен.

Получение ферментов в очищенном состоянии заключается в выделении фермента из клеток и тканей, отделении его от сопутствующих ферментов и инертных веществ, и, наконец, кристаллизации фермента. Такая полная очистка, осуществленная для сравнительно ограниченного числа ферментов, представляет довольно сложную экспериментальную задачу. Даже сравнительно неглубокая очистка ферментных препаратов бывает связана со значительными трудностями, особенно ввиду ничтожного количества фермента в исходном материале. Практически наиболее часто исследованию подвергаются препараты ферментов большей или меньшей степени очистки или же непосредственно те объекты животного или растительного происхождения, в которых находится изучаемый фермент.

Вследствие этого и задача в большинстве случаев сводится к изучению условий и характера ферментативной реакции, после того как ферментативная природа ее доказана в достаточной степени надежно.

Работа 24. **Получение препарата сахаразы из дрожжей**

Сахараза ускоряет гидролиз сахарозы на *d*-глюкозу и *d*-фруктозу. Сама сахароза не восстанавливает при нагревании реактивы Фелинга и Барфёда, а продукты ее гидролиза восстанавливают (см. работы 45 и 56) и по реакции восстановления можно судить о наличии процесса гидролиза.

100—200 г дрожжей хорошо растирают с чистым песком и высушивают в тонком слое на воздухе. Растирают в порошок и извлекают двойным от веса взятых дрожжей объемом воды, фильтруют и добавляют к фильтрату при перемешивании избыток ацетона. Выпавший осадок отсасывают, высушивают на воздухе и измельчают в порошок. Для работы пользуются водным извлечением этого порошка.

В две пробирки помещают по 1 мл полученного раствора сахаразы, добавляют по 5 мл 1% раствора сахарозы и ставят в термостат при 38°. Параллельно ставят такой же опыт с 1 мл прокипя-

ченного раствора сахаразы. Через 15—20 минут к содержимому первой пробирки добавляют равный объем реактива Фелинга, а во вторую — реактива Берфёда и нагревают до кипения. Образование красного осадка закиси меди указывает на присутствие *d*-глюкозы и *d*-фруктозы. В контрольном опыте восстановления нет.

Работа 25. **Получение препарата, содержащего панкреатическую амилазу**

Панкреатическая амилаза — фермент, ускоряющий гидролиз глюкозидных связей в молекулах полисахаридов (крахмала, гликогена). Подобно амилазе слюны она активируется хлористым натрием и оптимально активна при pH = 6,8.

Препарат, содержащий панкреатическую амилазу, получается или извлечением поджелудочной железы водным глицерином, или же получают сухой препарат (сухой панкреатин). В том и другом случае препарат содержит, наряду с амилазой, много липазы и протеазы, которые, если хотят препарат очистить, удаляют адсорбцией с помощью глинозема и каолина.

Поджелудочную железу, по возможности, освобождают от жировой ткани, измельчают, смешивают с пятикратным объемом ацетона и встряхивают около двух часов. Фильтруют, осадок снова обрабатывают ацетоном, затем ацетоном с эфиром (1 : 1) и, наконец, два раза двойным объемом эфира. Затвердевший осадок высушивают на фильтровальной бумаге, тщательно измельчают в ступке или шаровой мельнице и просеивают через тонкое сито. Получают светлый порошок. Препарат при настаивании при 30° с 10 частями 85%-ного водного глицерина или с 50 частями воды дает прозрачные растворы, содержащие трипсин, липазу и панкреатическую амилазу, причем амилаза переходит в раствор наиболее легко и полно.

Берут четыре пробирки и наливают в каждую по 3 мл 0,25% раствора крахмала, а затем в пробирки № 1 и 2 по 1 мл дестиллированной воды, в пробирку № 3—1 мл 0,1 н. соляной кислоты и в пробирку № 4—1 мл 0,1% раствора хлористого натрия. После того, по возможности одновременно, приливают в пробирки № 1, 3, и 4 по 1 мл экстракта панкреатической амилазы, а в пробирку № 2—1 мл прокипяченного и охлажденного экстракта. Тотчас ставят все пробирки в термостат при 38°. Время от времени из пробирок отбирают по капле жидкости и переносят в разбавленный раствор иода в иодистом калии и, таким образом, следят за скоростью расщепления крахмала. В пробирке № 2 расщепление крахмала не происходит, так как фермент инактивирован нагреванием, а в пробирке № 3 расщепление идет очень медленно, вследствие высокой кислотности (оптимум активности панкреатической амилазы pH = 6,8). Сравнивают скорость гидролиза в пробирках № 1 и 4.

Работа 26. Гидролитическое расщепление жира при действии панкреатической липазы

Панкреатическая липаза ускоряет реакцию гидролиза сложноэфирных связей в молекуле жиров (триглицеридов), протекающую с образованием глицерина и жирных кислот, и гидролиз некоторых других сложных эфиров, например, этиловых эфиров высокомолекулярных жирных кислот. Оптимум действия панкреатической липазы лежит при pH=7,0—8,0, однако, как и для многих других ферментов значение оптимума зависит от присутствия тех или иных сопутствующих веществ и состава буферной смеси. При прочих равных условиях липокластическое расщепление протекает тем энергичнее, чем выше степень дисперсности жира. В физиологических условиях, при гидролизе жиров в кишечнике, существенную роль играет желчь. При щелочной реакции панкреатическая липаза активируется желчными солями, солями кальция, мылами и альбумином.

В качестве раствора, содержащего панкреатическую липазу, может служить водно-глицериновая вытяжка из сухого панкреатина (см. предыдущую работу) или глицериновый экстракт поджелудочной железы. В качестве субстрата ферментативной реакции служит жир молока.

В две пробирки наливают по 5 мл предварительно прокипяченного и охлажденного молока. Затем в каждую добавляют по одной капле фенолфталеина и осторожно, по каплям, 1%-ного раствора соды до розового окрашивания. После этого в первую пробирку приливают 1 мл глицеринового экстракта поджелудочной железы, содержащего липазу, а во вторую —1 мл того же экстракта, но предварительно прокипяченного и охлажденного. Обе пробирки ставят на 20—25 минут в термостат при 37°.

Окраска в первой пробирке исчезает вследствие связывания избыточной щелочи образующимися при липокластическом процессе жирными кислотами:

$$\begin{array}{l} CH_2OOCR \\ | \\ CHOOCR \\ | \\ CH_2OOCR \end{array} + 3H_2O \rightleftharpoons \begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array} + 3RCOOH$$

$$RCOOH + Na_2CO_3 = RCOONa + NaHCO_3$$

Во второй пробирке этого изменения цвета нет (остается розовая окраска) ввиду отсутствия гидролитического процесса (фермент инактивирован нагреванием).

Работа 27. Кинетика гидролитического расщепления жира под действием липазы

В качестве субстрата ферментативной реакции служит жир молока, находящийся в диспергированном состоянии. Образующиеся при гидролизе жирные кислоты оттитровываются раствором

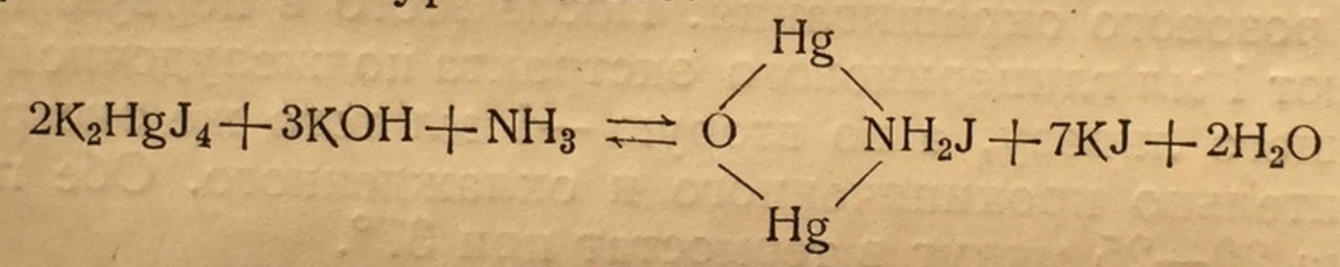
едкого натра по фенолфталеину и по их приросту судят о течении липокластического процесса.

Берут 50 мл предварительно прокипяченного и охлажденного молока и добавляют в ту же колбу 3 мл глицеринового раствора липазы. Тотчас же берут пипеткой 5 мл смеси и титруют 0,01 н. едким натрием по фенолфталеину и оставшуюся смесь ставят в термостат при 38° и замечают время. Через определенные промежутки времени (через каждые 10—15 минут) берут пробы по 5 мл и также титруют 0,01 н. едким натром. Полученные результаты изображают графически, откладывая по оси абсцисс время, а по оси ординат количество миллилитров 0,01 н. NaOH, пошедших на титрование.

Работа 28. **Получение препарата уреазы из бобов сои**

Активная уреаза находится во многих высших растениях и у бактерий[1]. Одним из источников для ее получения служат бобы сои. Гидролиз мочевины, катализируемый уреазой, приводит к образованию углекислого аммония, который может быть обнаружен или по изменению реакции среды (на фенолфталеин), или пробой на аммиак с реактивом Несслера (приготовление см. раздел реактивы).

Реактив Несслера — раствор $K_2H_gJ_4$ реагирует с аммиаком в щелочной среде при pH не ниже 12 с образованием буровато-желтого окрашивания по уравнению:



$$2K_2HgJ_4 + 3KOH + NH_3 \rightleftharpoons O\begin{matrix}Hg\\ \diagup \quad \diagdown \\ Hg\end{matrix}NH_2J + 7KJ + 2H_2O$$

Избыток KOH смещает реакцию направо, а избыток KJ — налево. Получаемая окраска чувствительна к реакции среды. Чем меньше количество присутствующего KJ, тем чувствительнее реакция на аммиак. При большом количестве KJ реактив вообще не чувствителен. Чувствительность реактива пропорциональна количеству растворенной HgJ_2.

Сухие бобы сои тщательно измельчают и обезжиривают многократным настаиванием с петролейным эфиром. Обезжиренную муку бобов высушивают на фильтровальной бумаге на воздухе и извлекают пятикратным объемом воды при температуре +5°. Центрифугируют и прозрачный центрифугат испаряют досуха под вакуумом при температуре 35—40°. Полученный порошок хорошо растворим в воде.

К нескольким миллилитрам 1%-ного раствора мочевины добавляют одну-две капли фенолфталеина и 1—2 мл раствора уреазы

---

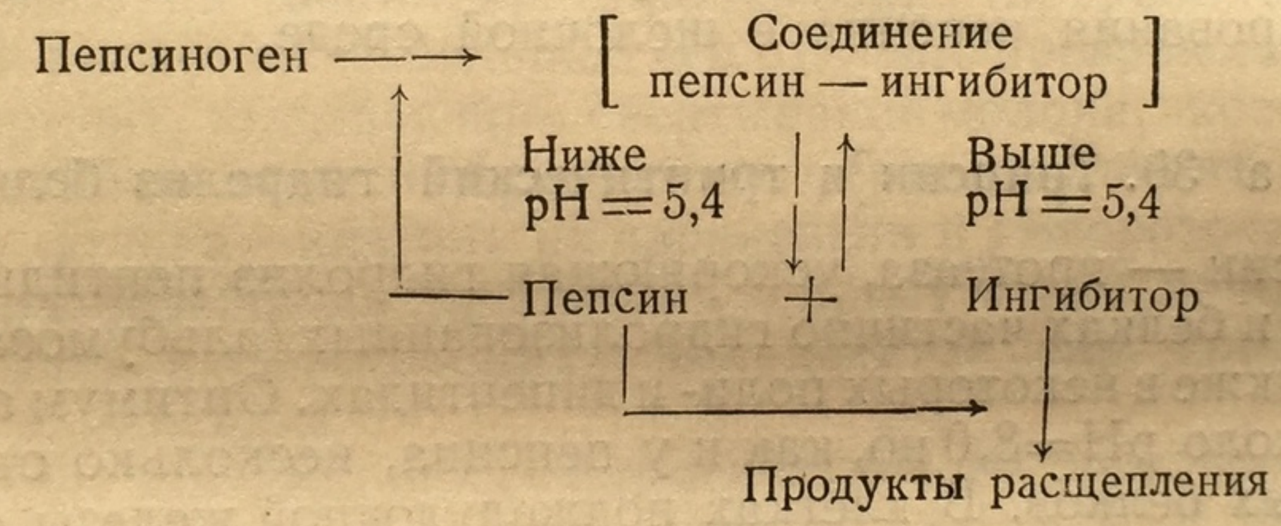
[1] Уреаза часто применяется для определения мочевины в различных биологических объектах животного происхождения.

(1 : 10) и ставят в термостат при 38° или 40° на 30 минут. Параллельно ставят такой же опыт с прокипяченным раствором уреазы. Содержимое первой пробирки делается красным (образование углекислого аммония).

Образование аммиака можно обнаружить и иным путем. Для этого повторяют опыт и после нагревания при 38° осторожно добавляют раствор едкого натра. Выделение аммиака замечают по запаху и по буровато-желтому окрашиванию при добавлении нескольких капель реактива Несслера.

Работа 29. **Получение препарата пепсина**

Пепсин—протеаза (фермент, ускоряющий гидролиз белковых веществ), обнаруживаемая в желудочном соке и активная при pH =1,6—2,0. Клетки слизистой оболочки желудка образуют неактивную форму пепсина — пепсиноген. Пепсиноген при действии пепсина превращается в пепсин, который, однако, при кислотности среды выше pH = 5,4, остается связанным в неактивном состоянии с веществом полипептидного характера (ингибитором). Только при кислотности более высокой, т. е. при pH меньшем чем 5,4 пепсин освобождается из этого соединения, и ингибитор подвергается разрушению за счет дальнейшего действия пепсина.



Таким образом, автокаталитическое образование пепсина из пепсиногена протекает только при достаточно высокой кислотности и, следовательно, не в клетках слизистой, а в желудочном соке, содержащем соляную кислоту (pH = 1,2).

Измельченную слизистую оболочку свиного желудка (или желудка крупного рогатого скота) экстрагируют при перемешивании при 20—30° десятикратным объемом 0,5% соляной кислоты в течение 3—5 часов. Фильтруют через марлю и остаток снова экстрагируют тем же способом. К соединенным фильтратам добавляют твердого измельченного хлористого натрия до 15%. Выпавший осадок отделяют фильтрованием или лучше центрифугированием, снова растворяют в 0,5%-ной соляной кислоте и снова осаждают хлористым натрием. Осадок хорошо отжимают, по возможности быстро высушивают при обычной температуре (20—25°) и измельчают.

Берут четыре пробирки и в каждую из них помещают по нескольку волокон фибрина (белок, образующийся при свертыс-

вании крови), приблизительно поровну во всех пробирках. Затем в первую пробирку наливают 5 мл раствора пепсина в 0,2%-ной соляной кислоте, во вторую — 5 мл того же раствора, предварительно нейтрализованного по фенолфталеину добавлением 0,1н. раствора едкого натра, в третью — 5 мл предварительно прокипяченного раствора пепсина и в четвертую — 5 мл 0,2%-ной соляной кислоты. Все четыре пробирки одновременно ставят на 20—30 минут в термостат при 38°. Только в первой пробирке, в результате протеокластического расщепления, происходит растворение волокон фибрина. Одна соляная кислота не изменяет фибрина, если не считать легкого набухания волокон, а в нейтральной среде пепсин оказывается недостаточно активным (оптимум действия пепсина лежит при pH=1, 6—2,0 и для различных белков он несколько отличен). В разбавленных же щелочных растворах пепсин вообще разрушается, что показывает следующий опыт. К 5 мл раствора пепсина в 0,2%-ной соляной кислоте добавляют 1,0 н. раствора едкого натра до ясной щелочной реакции и ставят на 30 минут в термостат при 37°. Затем охлаждают, осторожно нейтрализуют 0,1 н. соляной кислотой и к полученному нейтральному раствору добавляют равный объем 0,1 н. соляной кислоты и волокно фибрина. Ставят в термостат при 37° на 20—30 минут. Растворения фибрина не наступает, вследствие необратимого инактивирования пепсина в щелочной среде.

Работа 30. Трипсин и триптический гидролиз белка

Трипсин — протеаза, ускоряющая гидролиз пептидных связей в белках и белках частично гидролизованных (альбумозах и пептонах), а также в некоторых поли- и дипептидах. Оптимум активности лежит около pH=8,0 но, как и у пепсина, несколько отличен для различных белков. В клетках поджелудочной железы образуется неактивная форма трипсина — трипсиноген, поэтому как свежая железа, так и ее секрет не обнаруживают триптической активности. Трипсиноген превращается в активный трипсин под действием энтерокиназы (активатора ферментативной природы, выделяемого из слизистой тонких кишок), трипсина и концентрированных растворов солей. Превращение трипсиногена в трипсин при pH = 7,5—8,5 протекает под действием трипсина, т. е. является автокаталитическим процессом. При хранении поджелудочной железы наблюдается превращение трипсиногена в трипсин.

Трипсиноген образуется в клетках поджелудочной железы наряду с другими ферментами. Кроме уже упомянутых амилазы и липазы в панкреатической железе образуются химотрипсин (химотрипсиноген), протаминаза и карбоксипептидаза.

Для получения препарата, содержащего трипсин, поджелудочную железу, по возможности, освобождают от жира и соединительной ткани, измельчают и оставляют лежать на воздухе около 5—10 часов. Затем добавляют водного глицерина (на 1 г железы

4 мл 50%-ного глицерина очень слабо подкисленного уксусной кислотой) и перемешивают около двух часов. После суточного настаивания центрифугируют и отделяют водно-глицериновый экстракт, который содержит кроме трипсина панкреатическую амилазу и липазу. Перед употреблением экстракт разводят, добавляя равный объем воды.

В три пробирки помещают по приблизительно одинаковому количеству предварительно обработанного кипящей водой фибрина (одно-два волокна в каждую пробирку). Затем в первую пробирку наливают 5 мл 0,4%-ного раствора соды и 2 мл экстракта, во вторую — 5 мл. воды и 2 мл предварительно прокипяченного экстракта и в третью — 5 мл 0,1 н. соляной кислоты и 2 мл экстракта. Все три пробирки ставят в термостат при 38° и, встряхивая через 5—10 минут, следят за растворением волокон фибрина. Растворение происходит только в первой пробирке, где фермент не инактивирован и реакция среды слабощелочная.

Работа 31. Коагулирующее действие химозина и других протеаз

В клетках слизистой оболочки желудка образуется неактивная форма химозина (реннина)— прохимозин (проренни н). Прохимозин при кислотности большей чем pH=5,0 превращается в химозин — фермент, вызывающий свертывание молока, которое представляют собою конечный результат ферментативного расщепления белка молока—казеина на параказеин и сывороточную альбумозу. Образовавшийся параказеин в присутствии ионов кальция превращается в нерастворимую кальциевую соль, которая и выпадает в виде осадка.

Химозин, специфичность ферментативного действия которого ограничена упомянутым превращением казеина в параказеин (коагулазное действие), образуется в значительных количествах слизистой сычуга телят, откуда он и носит название сычужного фермента. Однако, коагулирующее действие не является исключительно присущим химозину, но свойственно почти всем животным и растительным протеазам: пепсину, химотрипсину, папаину и др. Оптимальное pH коагулирующего действия химозина =5,4, пепсина =5,3, химотрипсина =7,0. Химозин практически неактивен при pH=7,0, но относительно устойчив в сравнении с пепсином в щелочной среде при pH =9,0 (пепсин быстро инактивируется при pH=9).

Для получения препарата химозина хорошо измельченную слизистую оболочку сычуга теленка извлекают при перемешивании 0,04 н. соляной кислотой, беря на одну часть слизистой одну часть кислоты. Через 10—15 минут фильтруют через марлю. Фильтрат с pH =5,2 диализируют против водопроводной воды до тех пор, пока раствор фермента не достигнет pH=5,4 (около 3—4 часов). Затем к раствору фермента добавляют алкоголя до

концентрации 50% и выпавший осадок отделяют центрифугированием. Осадок снова растворяют в дестиллированной воде и отделяют центрифугированием нерастворившийся белок (муцин). К раствору снова добавляют алкоголь до концентрации 50% и выпавший осадок фермента отделяют, отжимают, высушивают на воздухе и измельчают.

0,1 г сухого препарата сычужного фермента извлекают в течение суток 50 мл воды при температуре около +5° и при повторном встряхивании жидкости. Прозрачный раствор употребляют для опытов. В четыре пробирки наливают по 5 мл свежего молока (pH= 6,6—6,8). Затем в первую прибавляют 0,25 мл раствора химозина, во вторую — 0,25 мл раствора химозина и несколько капель 10%-ного раствора едкого натра, в третью — 0,25 мл предварительно прокипяченного раствора химозина и в четвертую — 0,25 мл раствора химозина и несколько капель 2%-ного раствора щавелевокислого калия. Все пробирки ставят на 15—20 минут в термостат при 37—40°.

Только в первой пробирке происходит свертывание. Во второй пробирке свертывание не происходит вследствие слишком высокой щелочности раствора, в третьей — фермент инактивирован нагреванием, а в четвертой — растворимые соли кальция удалены из раствора в виде нерастворимого щавелевокислого кальция. При таком удалении солей кальция молоко не свертывается, но ферментативное расщепление казеина с образованием параказеина происходит. Поэтому, если четвертую пробирку прокипятить для полного устранения дальнейшего действия фермента и по охлаждении добавить немного 2%-ного раствора хлористого кальция, то параказеин превращается в кальциевую соль, в результате чего происходит свертывание.

Повторяют все эти опыты, беря вместо раствора химозина раствор пепсина (см. работу 29), предварительно нейтрализованный по метилоранж.

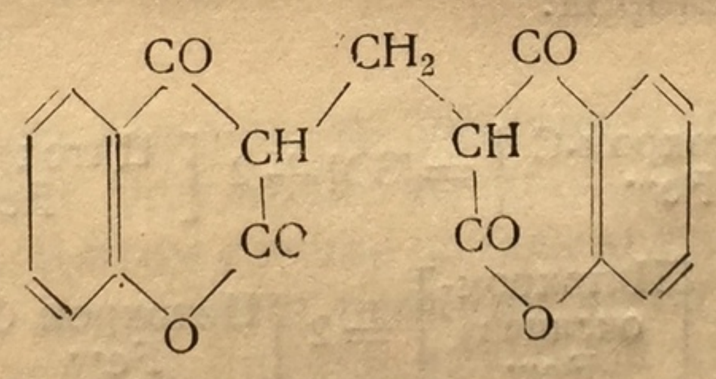
Работа 32. Свертывание крови — действие тромбина (фибрин-фермента)

Начало изучению химии процесса свертывания крови было положено классическими исследованиями А. Шмидта в Юрьевском университете (гор. Тарту — Эстонской ССР).

Свертывание крови — ферментативный процесс, при котором растворимый глобулиноподобный белок плазмы крови — фибриноген (изоэлектрический пункт pH = 5,4) превращается в нерастворимый белок — фибрин (изоэлектрический пункт pH= 6,6). В норме в плазме крови около 0,3% фибриногена. Его превращение в фибрин, повидимому, сходное с реакциями гидролитического расщепления, происходит при участии фермента тромбина. В плазме крови, циркулирующей в сосудах, находится неактивная форма тромбина — протромбин (тромбоген). Для образования активного тромбина

необходимо взаимодействие, по крайней мере, трех компонентов: 1) неактивного протромбина (тромбогена), 2) тромбокиназы, находящейся в тромбоцитах или клетках тканей, и 3) ионов кальция. Таким образом, присутствие ионов кальция необходимо и здесь также, как и при свертывании молока; однако, механизм их действия в этих двух случаях совершенно различен. При свертывании крови ионы кальция участвуют в предварительной реакции образования активной формы фермента (тромбина) и, следовательно, в их отсутствии ферментативная реакция превращения фибриногена в фибрин невозможна.

Известен целый ряд различных веществ, ускоряющих или, наоборот, замедляющих свертывание крови. Среди них отличают активаторы и ингибиторы реакции превращения протромбина в тромбин и активаторы и ингибиторы реакции превращения фибриногена в фибрин, т. е. собственно свертывания крови. Первый из упомянутых процессов ускоряется трипсином и замедляется гепарином, солями желчных кислот, нуклеиновыми кислотами, оксалатами, связывающими кальций в нерастворимой форме, цитратами, фтористыми и другими солями. Реакция превращения фибриногена в фибрин ускоряется папаином, ядами некоторых змей и угнетается некоторыми клеточными белками, ядом кобры и гирудином. В физиологических условиях свертывание крови ускоряется или угнетается воздействием веществ, влияющих на содержание протромбина в плазме крови. К таким веществам, вызывающим гиперпротромбинэмию, относятся: витамин К, фтиокол, 2-метил-1,4-нафтохинон и другие антигеморрагические реагенты. Наоборот, уровень протромбина в плазме крови падает (гипопротромбинэмия) при воздействии таких соединений, как дикумарол.



Для получения оксалатной крови и плазмы собирают свежевыпущенную из кровеносного сосуда кровь в колбу, в которую наливают по 1 мл 10%-ного раствора щавелевокислого аммония на каждые 100 мл крови (или же по 0,1 г сухого оксалата аммония) таким образом, что собранная кровь содержит около 0,1—0,2% оксалата. Колбу осторожно вращают для полного перемешивания, в результате чего весь кальций осаждается в виде щавелевокислого кальция и кровь теряет способность свертываться. Оксалатную кровь центрифугируют и отбирают находящуюся над осевшими форменными элементами плазму.

Для получения дефибринированной крови и сыворотки свежесобранную кровь помешивают в стакане стеклянной палочкой,

причем нити выделяющегося фиорина собираются на палочке. Собранный фибрин завертывают в марлю и промывают в токе воды до обесцвечивания. Жидкую дефибринированную кровь фильтруют через марлю и центрифугируют. Форменные элементы оседают на дно и остается прозрачная сыворотка, которую снимают пипеткой.

Для исследования свертывания крови берут пять пробирок, причем в пробирки № 1 и 2 помещают по 3 мл оксалатной плазмы, в пробирку № 3 —3 мл дефибринированной крови, в пробирку № 4—3 мл сыворотки и в пробирку № 5—3 мл оксалатной крови. Затем во все пробирки, кроме № 1, добавляют по 0,3 мл 3%-ного раствора хлористого кальция и ставят пробирки в термостат при температуре 37—38°. Через 15—20 минут пробирки вынимают из термостата. Свертывание происходит только в пробирках № 2 и 5.

Работа 33. **Сукциндегидраза мышц**

Сукциндегидраза — фермент широко распространенный в тканях животных, растений и микроорганизмов, ускоряет реакцию дегидрирования янтарной кислоты с превращением ее в фумаровую кислоту:

$$\begin{array}{l} CH_2-COOH \\ | \\ CH_2-COOH \end{array} + [SD] \rightleftarrows \begin{array}{l} CH-COOH \\ \| \\ HOOC-CH \end{array} + [SDH_2]$$

Гидрированная (восстановленная) сукциндегидраза переносит водород на систему цитохром-цитохромоксидазы, которая далее переносит его на кислород:

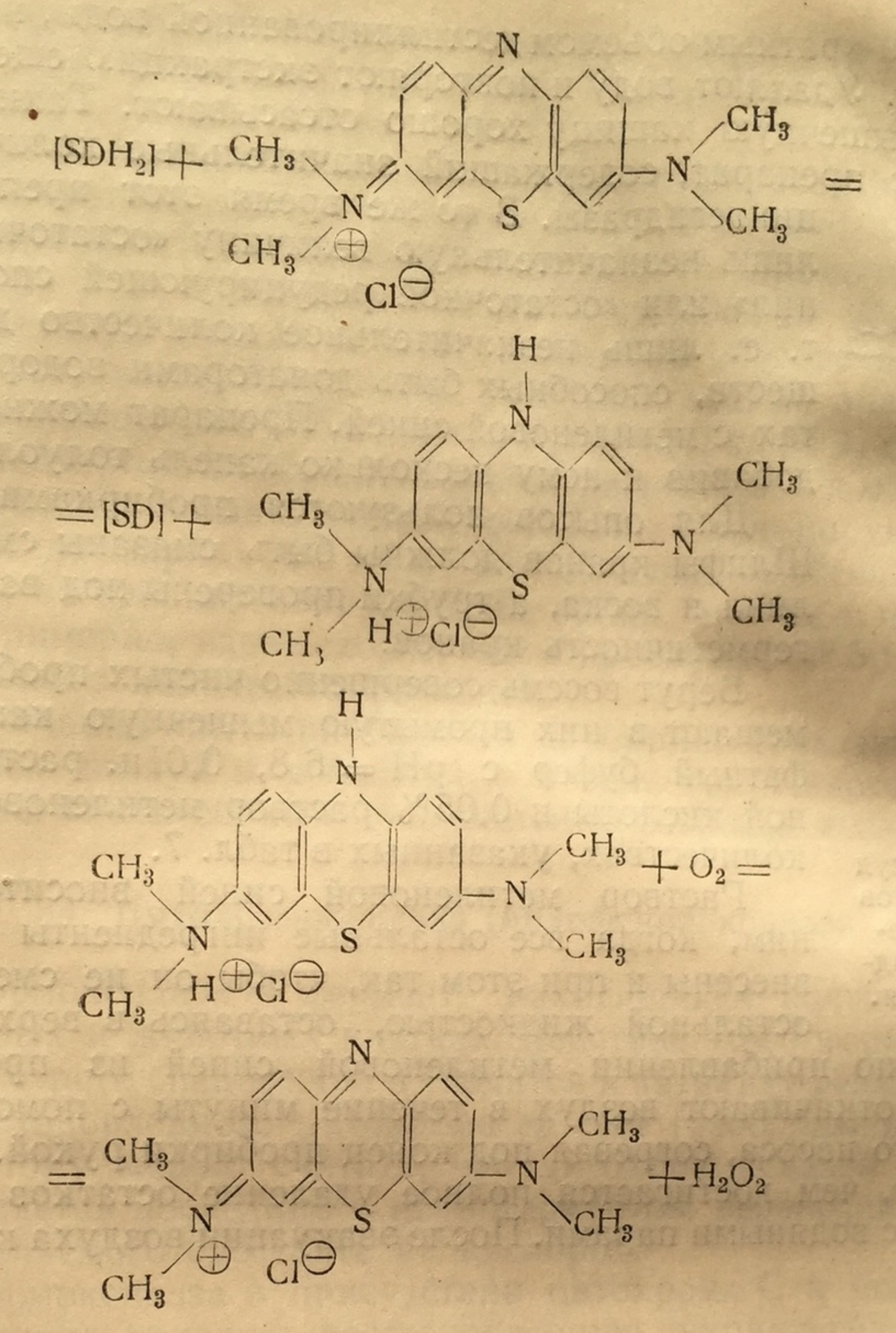
$$[SDH_2] + 2\left[\begin{array}{c}\text{Цитохром-C}\\ Fe^{\cdot\cdot\cdot}\end{array}\right] = [SD] + 2\left[\begin{array}{c}\text{Цитохром C}\\ Fe^{\cdot\cdot}\end{array}\right] + 2H^{\oplus}$$

$$2\left[\begin{array}{c}\text{Цитохром C}\\ Fe^{\cdot\cdot}\end{array}\right] + 2\left[\begin{array}{c}\text{Цитохром-}\\ \text{оксидаза}\\ Fe^{\cdot\cdot\cdot}\end{array}\right] = 2\left[\begin{array}{c}\text{Цитохром C}\\ Fe^{\cdot\cdot\cdot}\end{array}\right] + 2\left[\begin{array}{c}\text{Цитохром-}\\ \text{оксидаза}\\ Fe^{\cdot\cdot}\end{array}\right]$$

$$2\left[\begin{array}{c}\text{Цитохром-}\\ \text{оксидаза}\\ Fe^{\cdot\cdot}\end{array}\right] + {}^1/_2O_2 = 2\left[\begin{array}{c}\text{Цитохром-}\\ \text{оксидаза}\\ Fe^{\cdot\cdot\cdot}\end{array}\right] + O^{\ominus\ominus}$$

$$2H^{\oplus} + O^{\ominus\ominus} = H_2O$$

При введении метиленовой синей, тионина, индофеноловой голубой и некоторых других красителей сукциндегидраза переносит на них водород, после чего их лейкосоединения реагируют с кислородом:



Если же при этом исключить участие кислорода, т. е. вести процесс в анаэробных условиях, то протекает только первая из указанных реакций. В этом случае по обесцвечиванию метиленовой синей можно судить о наличии реакции дегидрирования того или иного субстрата (в данном случае янтарной кислоты).

Сукциндегидраза находится в значительном количестве в сердечной мышце, печени и почках, в меньшем количестве в скелетной мускулатуре и ткани легких и отсутствует в крови, селезенке и панкреатической железе. Сукциндегидраза активируется ионами кальция и угнетается пирофосфатами и малоновой кислотой, конкурирующей с янтарной в взаимодействии с ферментом. Сукциндегидраза нерастворима в воде, но растворима в слабощелочных растворах (извлекается фосфатным буфером при pH = 9,0). Она находится в мышечном соке, получаемом при прессовании мышц. В растворах неустойчива.

Для получения препарата сукциндегидразы хорошо измельченную сердечную мышцу (можно брать и скелетную мышцу) экстра-

гируют 20-кратным объемом дестиллированной воды, насыщенной толуолом. Удаляют воду и повторяют экстракцию еще два раза. Затем мышечную кашицу хорошо отсасывают. Таким образом, получают препарат, содержащий значительные количества сукциндегидразы. В то же время этот препарат имеет лишь незначительную величину «остаточного дыхания» или «остаточной редуцирующей способности», т. е. лишь незначительное количество других веществ, способных быть донаторами водорода в опытах с метиленовой синей. Препарат можно хранить, добавив к нему несколько капель толуола.

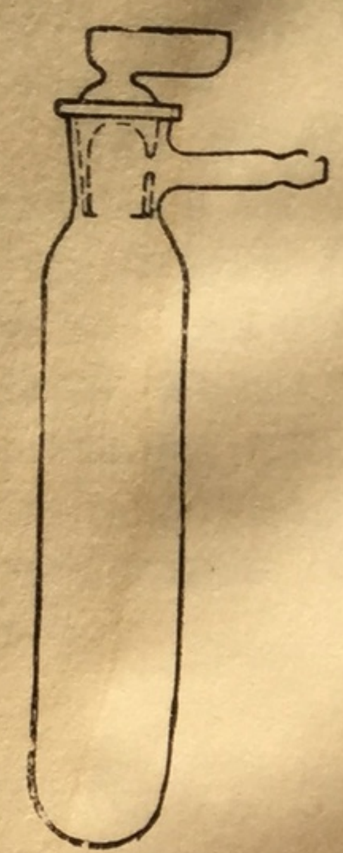


Рис. 7. Сосуд для опытов энзиматического дегидрирования.

Для опытов пользуются пробирками (рис. 7). Шлифы кранов должны быть смазаны смесью вазелина и воска, а трубки проверены под вакуумом на герметичность кранов.

Берут восемь совершенно чистых пробирок и помещают в них промытую мышечную кашицу, фосфатный буфер с pH = 6,8, 0,01н. раствор янтарной кислоты и 0,05% раствор метиленовой синей в количествах, указанных в табл. 7.

Раствор метиленовой синей вносится последним, когда все остальные ингредиенты смеси уже внесены и при этом так, чтобы он не смешивался с остальной жидкостью, оставаясь в верхнем слое. Тотчас по прибавлении метиленовой синей из пробирок по очереди откачивают воздух в течение минуты с помощью водоструйного насоса, согревая под конец пробирки рукой. Жидкость закипает, чем достигается полное удаление остатков кислорода воздуха с водяными парами. После эвакуации воздуха кран закры-

Таблица 7

Состав опытных смесей

Состав опытных смесей / № пробирки	1	2,3	4	5,6	7,8
Промытая мышечная кашица (г) . .	—	0,1	0,1 (прокипяченая)	0,1	0,2
Фосфатный буфер с pH=6,8 (мл) . .	1	1	1	1	1
0,01 н. янтарная кислота (мл) . . .	2	—	2	2	2
Дестиллированная вода (мл)	—	2	—	—	—
0,05% раствор метиленовой синей (мл)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

вают и пробирки встряхивают и помещают в термостат при 37°. Время от времени в течение опыта содержимое пробирок взбалтывают. Закрытие крана и встряхивание отмечают для каждой пробирки как время начала опыта, а время, когда содержимое про-

бирки приобретает едва заметную голубую окраску (в пробирках, где имеет место редукция), как конец опыта. Дожидаться совершенно полного обесцвечивания не следует.

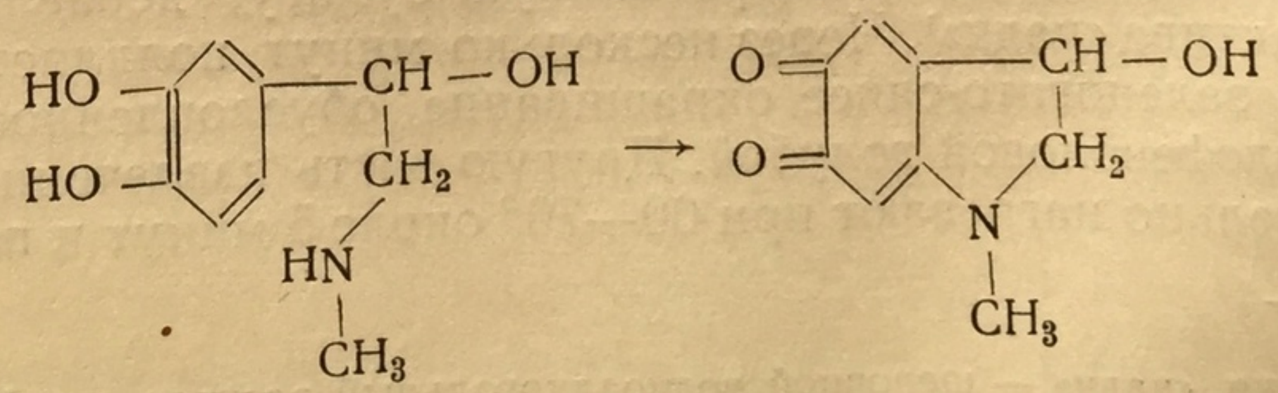
В пробирке № 1 (контрольной) изменения окраски не происходит (отсутствует фермент). Пробирки № 2 и 3 служат для определения «остаточной редуцирующей способности» промытой мышечной кашицы, т. е. содержания веществ, способных восстанавливать метиленовую синюю. В этих пробирках обесцвечивание или не происходит вовсе или на это требуется весьма значительное время. Примерно то же наблюдается и в пробирке № 4, где взятый фермент предварительно инактивирован нагреванием и может быть обнаружена лишь незначительная «остаточная редуцирующая способность». В пробирках № 5 и 6 и 7 и 8 почти полное обесцвечивание происходит за сравнительно короткое время, причем в пробирках № 7 и 8, примерно, вдвое скорее, чем в пробирках № 5 и 6, ввиду вдвое большего количества фермента.

По окончании опыта впускают в пробирки, показавшие обесцвечивание, воздух и убеждаются в том, что лейкосоединение метиленовой синей обратно окисляется кислородом воздуха.

Работа 34. **Цитохромоксидаза (индофенолоксидаза)**

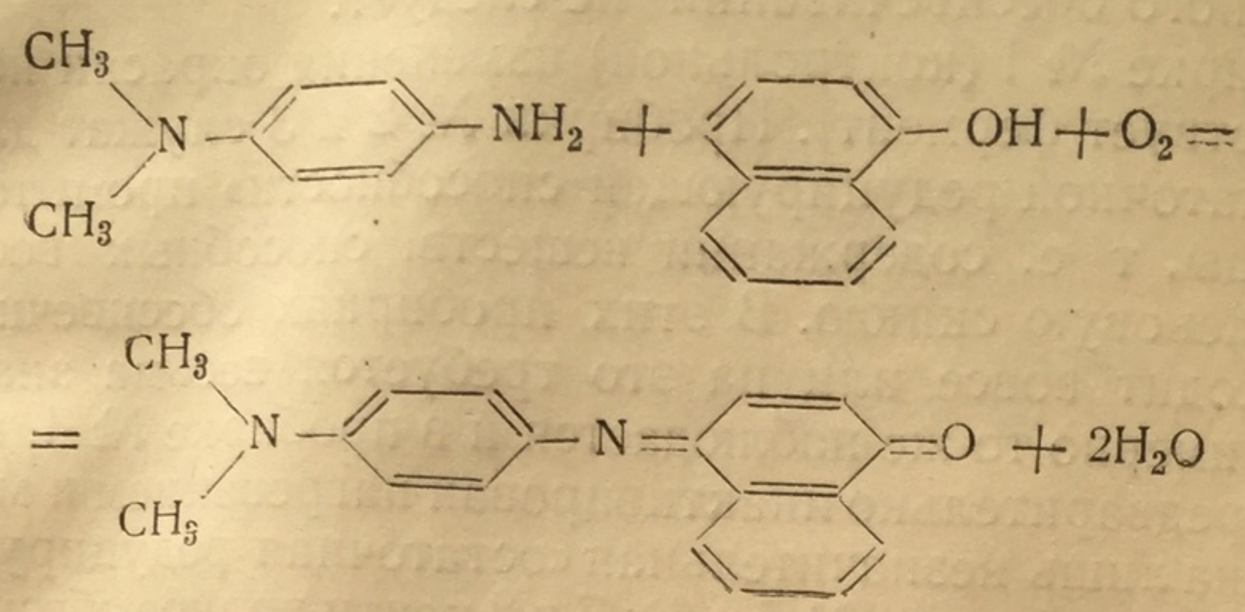
Цитохромоксидаза — фермент, находящийся почти во всех растительных и животных клетках. Действие этого фермента, по-видимому, строго специфично и сводится к катализу реакции окисления восстановленного цитохрома за счет газообразного кислорода. Поэтому можно считать, что цитохромоксидаза в живой клетке является последним в цепи ферментов, переносящих водород с окисляемого субстрата на кислород.

Цитохромоксидаза в присутствии цитохрома С и молекулярного кислорода окисляет восстановленную сукциндегидразу или систему янтарная кислота — сукциндегидраза (см. предыдущую работу). Кроме того, цитохром С может служить акцептором водорода при окислении некоторых аминов и фенолов, как, например, р-фенилендиамина, гидрохинона, пирокатехина, адреналина. Поэтому эти вещества окисляются цитохромом-цитохромоксидазой в присутствии кислорода. Адреналин при этом окисляется в красноокрашенный хинон — адренохром:



Щелочной раствор α-нафтола и N-диметил-р-фенилендиамина (так называемый реактив «нади») окисляется в присутствии цито-

хрома-цитохромоксидазы за счет молекулярного кислорода с образованием индофеноловой голубой:



Это образование индофеноловой голубой с реактивом «нади» служит к обозначению цитохромоксидазы как индофенолоксидазы. Однако, «индофеноловая реакция» не является специфичной для цитохромоксидазы, так как некоторые другие оксидазы (например, лакказа, фенолоксидаза), также образуют индофеноловую голубую с реактивом «нади» (см. работу 36).

Как цитохром, так и цитохромоксидаза (индофенолоксидаза) являются протеидами, содержащими в качестве активной группы железо-порфириновый комплекс и поэтому угнетаются HCN и H_2S.

Цитохромоксидаза служит примером фермента, прочно связанного с клеточной структурой. При извлечении ферментов из ткани она остается в нерастворившемся остатке. Кроме того, фермент цитохромоксидаза очень чувствителен к нагреванию и действию различных реактивов. Она инактивируется уже при нагревании до 55°, при высушивании и при действии ацетона и спирта.

Для получения препарата, содержащего цитохромоксидазу вместе с цитохромами, сердечную мышцу или скелетные мышцы хорошо измельчают и извлекают четырех-пятикратным объемом дестиллированной воды. Фильтруют, повторяют извлечение и снова фильтруют и промывают водой остаток ткани. Получается почти неокрашенная кашица, содержащая цитохромоксидазу, цитохромы C, a и b, наряду с некоторыми дегидразами (см. предыдущую работу).

К небольшому количеству извлеченной и промытой мышечной ткани, помещенной на фильтровальную бумагу, добавляют 1—2 капли реактива «нади»[1]. Через несколько минут появляется яркое синее или зеленовато-синее окрашивание, обусловленное образованием индофеноловой голубой. Другую часть извлеченной ткани предварительно нагревают при 60—70° около 5 минут и по охлаж-

---

[1] Реактив «нади» — щелочной водноалкогольный раствор α-нафтола и диметил-*p*-фенилендиамина, довольно быстро изменяется при хранении и должен быть свежеприготовленным. Реактив удовлетворительного качества имеет темную коричневую окраску без розоватого оттенка.

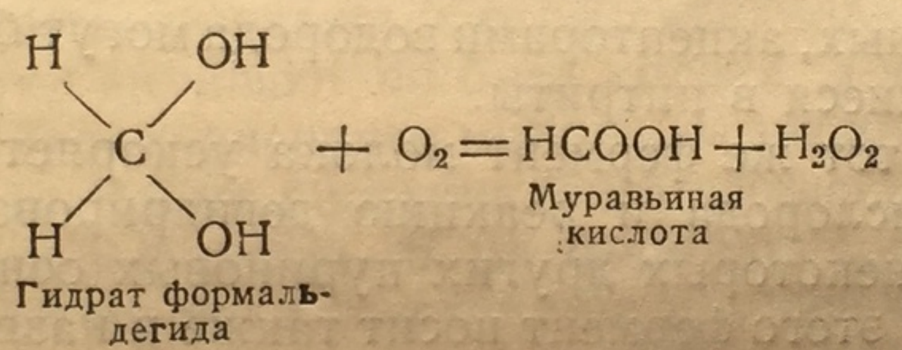
дении прибавляют реактив «нади». Окраска не появляется, что свидетельствует об инактивировании фермента.

В противоположность мышечной ткани, извлеченной водой, водный экстракт мышцы не дает окрашивания с реактивом «нади» (индофенолоксидаза удерживается, при извлечении водой, тканью). Окраска появляется только при добавлении к водному экстракту из мышцы кроме реактива «нади» нескольких капель раствора перекиси водорода (пероксидазное действие; см. работу 37).

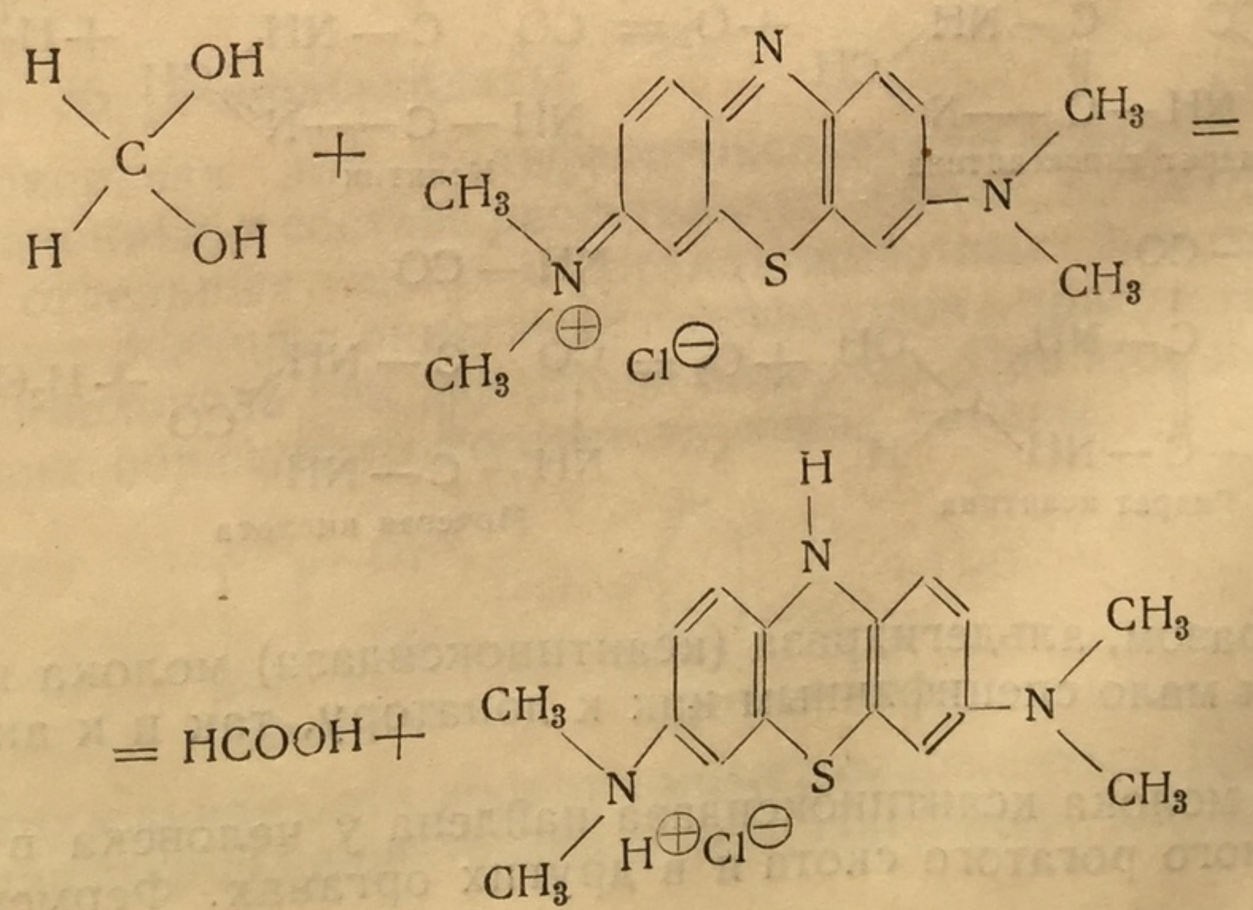
Часть извлеченной мышечной ткани помещают на фильтровальную бумагу и добавляют 1—2 капли спиртового раствора гваяковой смолы. При этом не наблюдается образования окраски, как это имеет место при пробах на фенолоксидазу (см. работу 36).

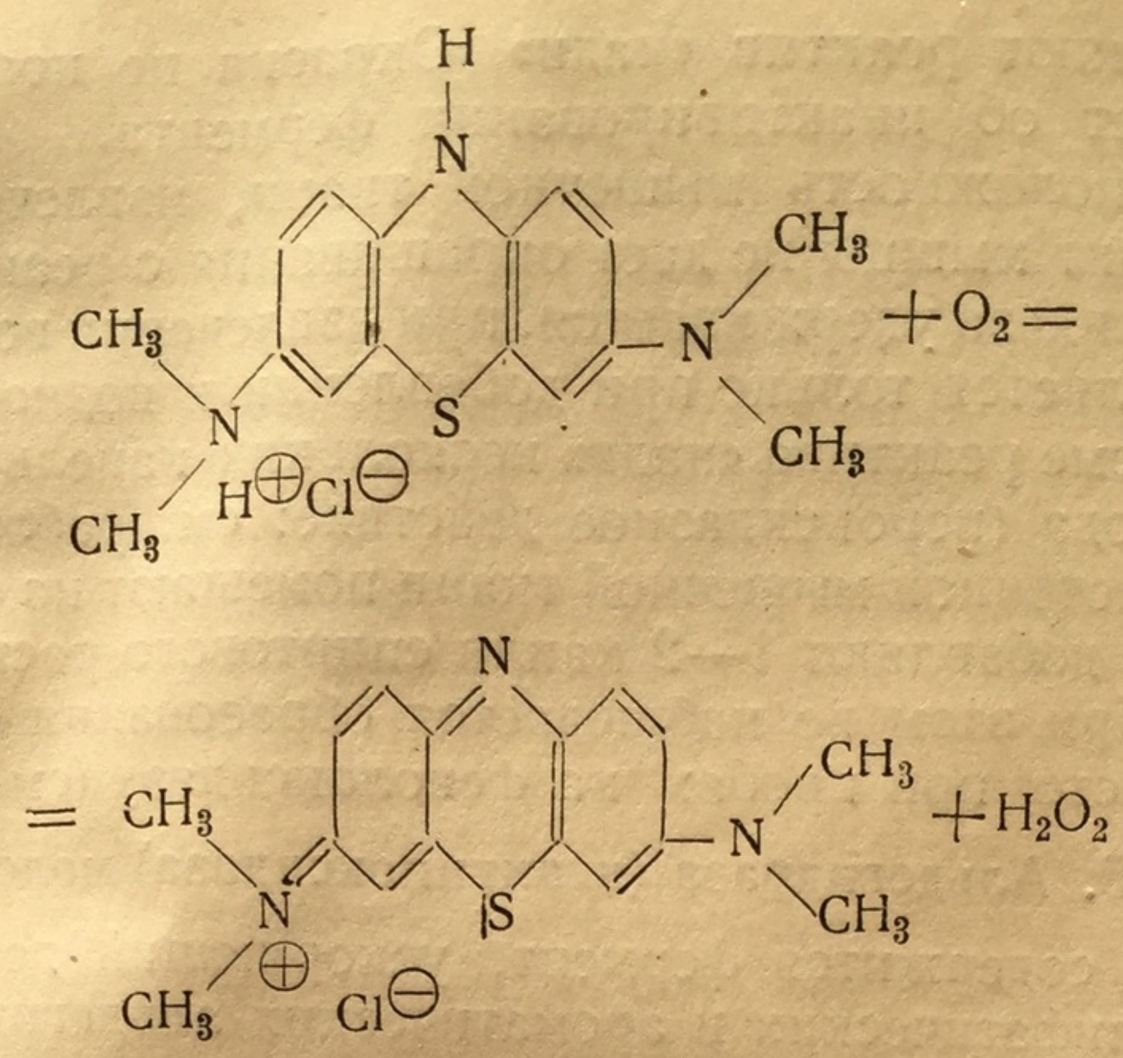
Работа 35. **Альдегидраза (ксантиноксидаза) молока**

В молоке содержится фермент, ускоряющий дегидрирование различных алифатических и ароматических альдегидов (формальдегида, ацетальдегида, бензальдегида, салицилового альдегида и других), почему этот фермент и носит название альдегидразы. Если реакция дегидрирования протекает в присутствии газообразного кислорода (в аэробных условиях), то водород переносится на кислород с образованием перекиси водорода. Например:



В присутствии метиленовой синей эта последняя служит акцептором, на который альдегидраза переносит водород с окисляемого альдегида:

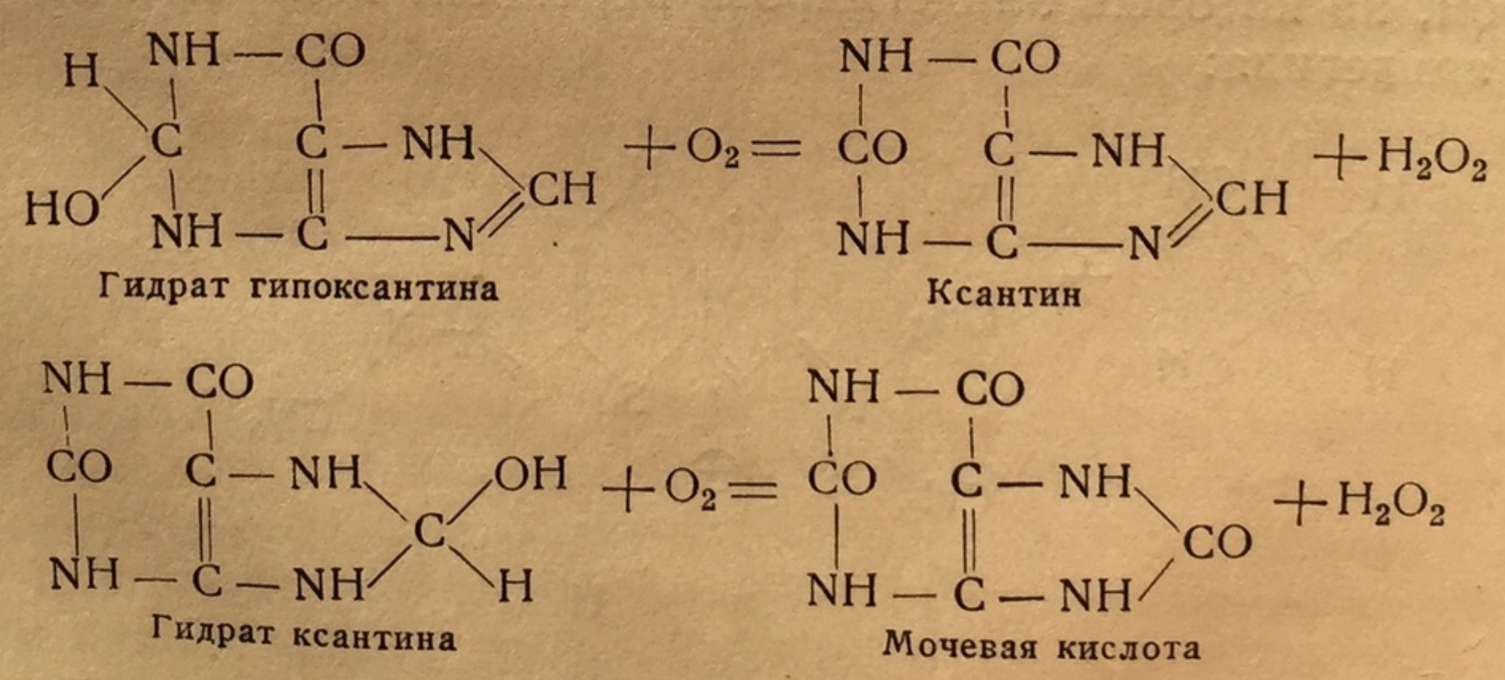




Если же в присутствии метиленовой синей вести процесс в анаэробных условиях, то протекает только первая из указанных реакций и, таким образом, действие альдегидразы может быть обнаружено по обесцвечиванию метиленовой синей.

Кроме указанных, акцепторами водорода могут быть и нитраты, восстанавливающиеся в нитриты.

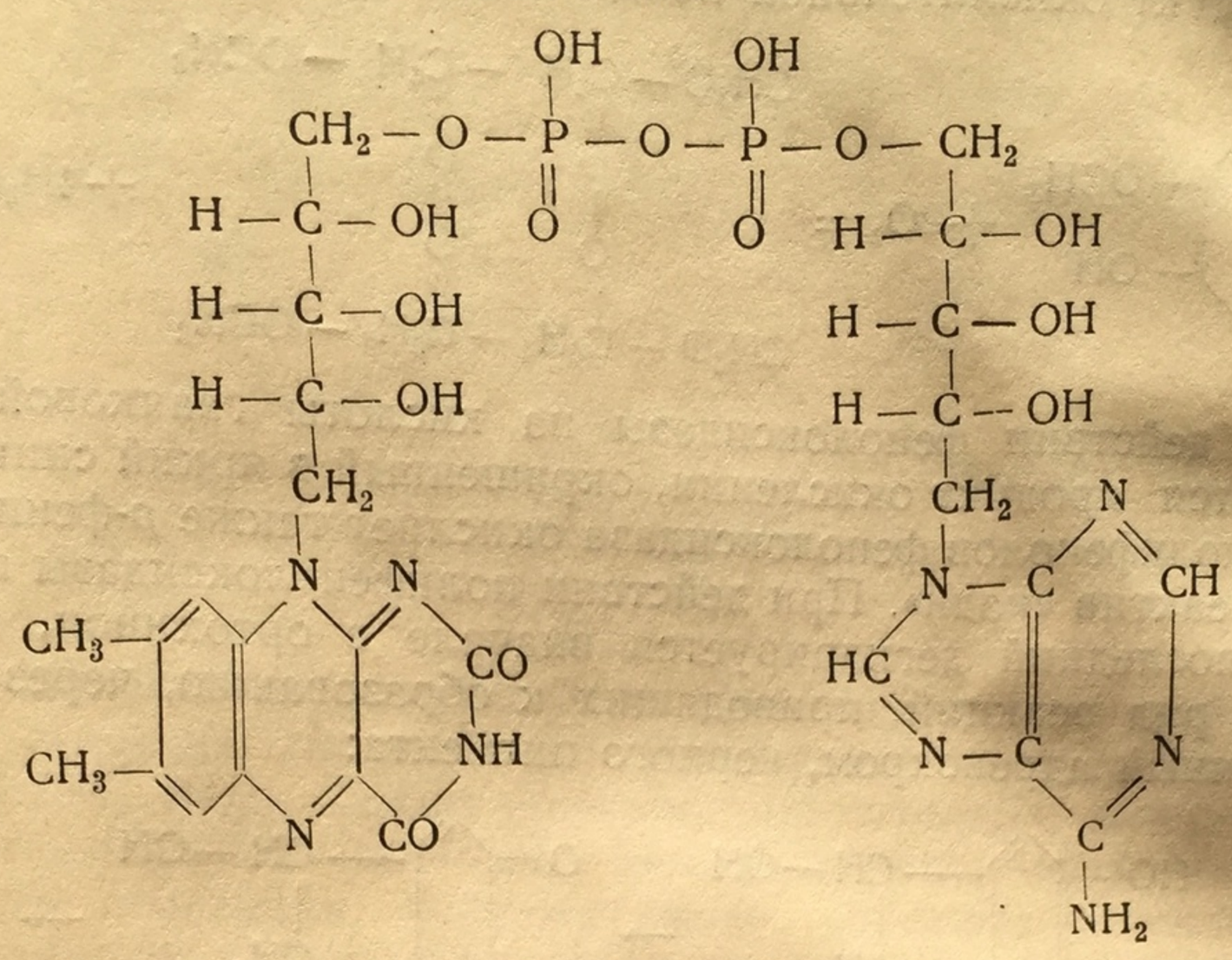
Повидимому, тот же фермент молока ускоряет в присутствии газообразного кислорода и реакцию дегидрирования гипоксантина, ксантина, некоторых других пуриновых оснований и кодегидразы I. Ввиду этого фермент носит также и название ксантиноксидазы. Дегидрирование гипоксантина и ксантина протекает по уравнениям:



Таким образом, альдегидраза (ксантиноксидаза) молока является ферментом мало специфичным как к донатору, так и к акцептору водорода.

Кроме молока ксантиноксидаза найдена у человека в печени, а у крупного рогатого скота и в других органах. Фермент пред-

ставляет собою протеид, содержащий в качестве активной группы изоаллоксазин-аденин-динуклеотид.

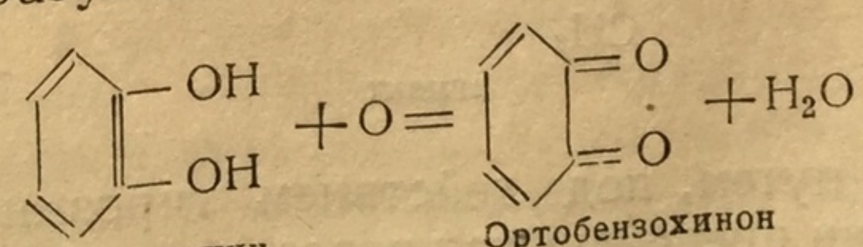


При опытах на альдегидразу молока с метиленовой синей необходимо иметь в виду, что бактерии также обесцвечивают метиленовую синюю и поэтому следует употреблять только свежее молоко.

В две пробирки наливают по 5 мл молока, а в третью — 5 мл предварительно прокипяченного молока. В первую и третью пробирки наливают по 0,3 мл реактива (5 мл насыщенного спиртового раствора метиленовой синей, 5 мл формалина и 190 мл воды), а во вторую — 0,3 мл водного раствора метиленовой синей. Жидкость во всех трех пробирках покрывается слоем парафинового масла, и пробирки ставят в термостат при 40°. Через некоторое время наблюдают полное обесцвечивание содержимого первой пробирки, в то время как вторая и третья остаются окрашенными в голубой цвет.

Работа 36. **Фенолоксидазы**

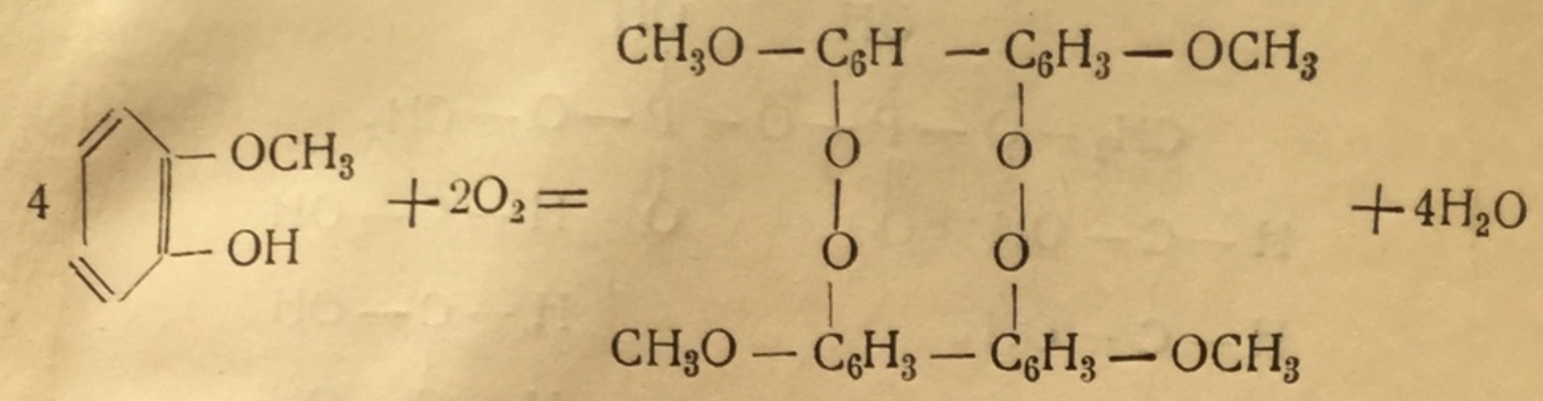
Фенолоксидаза или полифенолоксидаза — фермент широко распространенный в составе растительных клеток, но находящийся также и в отдельных тканях и органах животных. Фенолоксидаза катализирует реакцию окисления полифенолов в присутствии газообразного кислорода как акцептора водорода. При этом в простейших случаях образуются соответствующие хиноны:



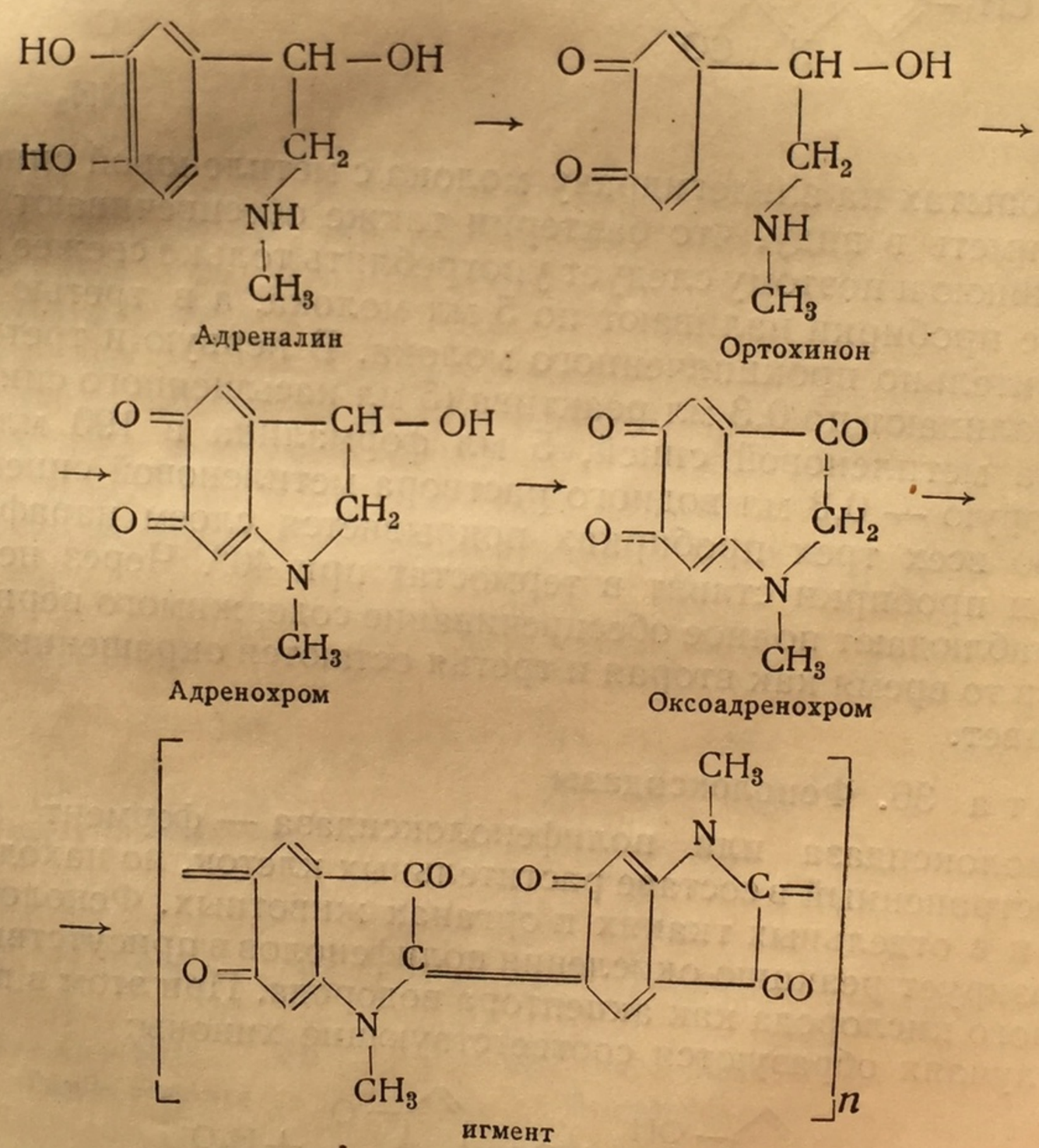
Пирокатехин Ортобензохинон

В других случаях эта реакция может осложняться процессами конденсации и дальнейшего окисления. Например, гваякол (моно-

метиловый эфир пирокатехина) при действии фенолоксидазы образует продукт окислительной конденсации красного цвета:

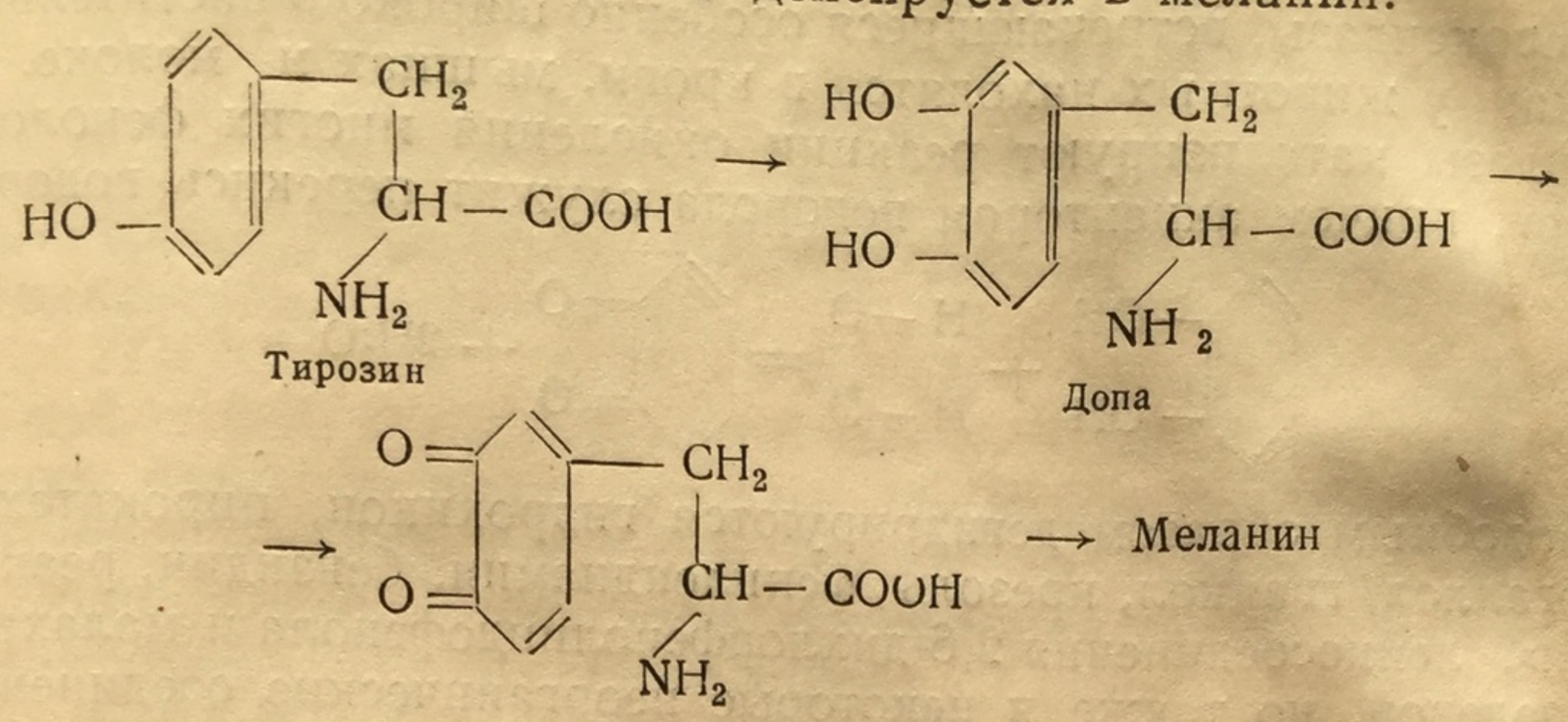


При действии фенолоксидазы на кислоты гваяковой смолы получается продукт окисления, окрашенный в яркий синий цвет. Кроме полифенолов фенолоксидаза окисляет также *p*-фенилендиамин и реактив «нади». При действии полифенолоксидазы на адреналин последний дегидрируется вначале в ортохинон, а затем следует ряд реакций, приводящих к образованию, через красно окрашенный адренохром, черного пигмента:

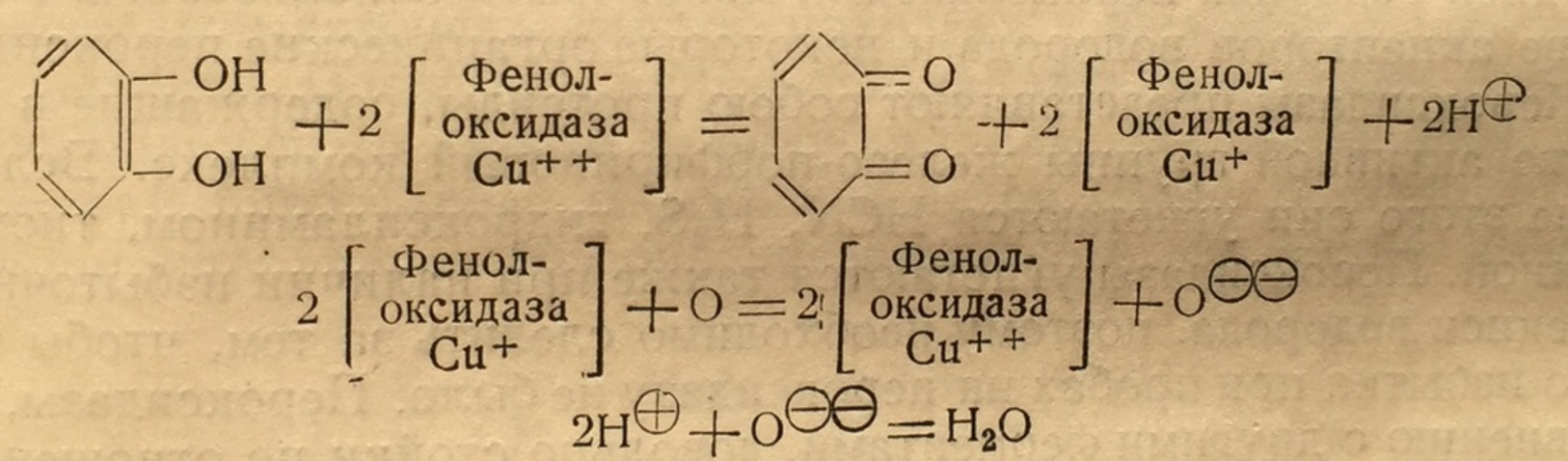


Подобным же путем, под действием тирозиназы (монофенолоксидазы), тирозин превращается через красно окрашенные промежуточные продукты в черный азотсодержащий пигмент — меланин. При этом тирозин вначале окисляется в диоксифенилаланин

(«допа»), который затем дегидрируется в хинон и далее через ряд промежуточных продуктов конденсируется в меланин:



Фенолоксидазы (полифенолоксидаза, лакказа, тирозиназа) по своему строению являются Cu-протеидами, содержащими около 0,20—0,25% меди. Таким образом, они сходны с дыхательными пигментами низших животных гемоцианинами, но, в противоположность последним, содержат медь, обратимо окисляющуюся молекулярным кислородом в двухвалентную. У растений и у многих животных фенолоксидазы или очень близкие к ним ферменты являются составной частью общей окислительной ферментативной системы, переносящей водород с окисляемого субстрата на кислород:

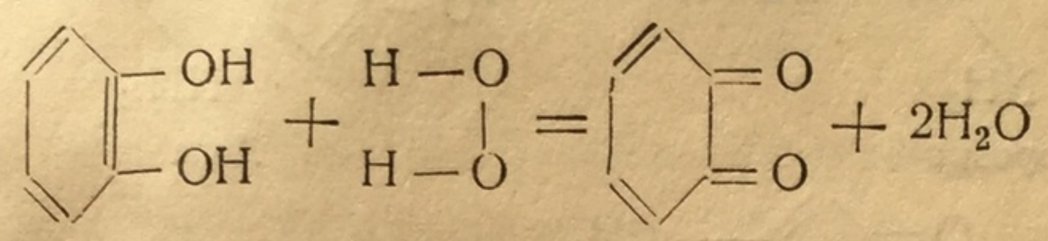


1. Проба с раствором гваяковой смолы. На разрез сырого картофеля (лучше всего пользоваться тонкими срезами с поверхностных частей картофельного клубня) наносят одну-две капли свежеприготовленного 5%-ного спиртового раствора гваяковой смолы. По прошествии некоторого времени появляется яркое синее окрашивание, обусловленное образованием окрашенных продуктов окисления гваяковой смоляной кислоты. Параллельно делают такой же опыт на разрезе вареного картофеля, причем синее окрашивание не появляется.

2. Проба с реактивом «нади». Реактив «нади» — щелочной раствор α-нафтола и диметил-*p*-фенилендиамина. При нанесении одной-двух капель этого реактива на разрез сырого картофеля постепенно появляется синее окрашивание, обусловленное образованием индофеноловой синей (см. работу 34). С вареным картофелем проба отрицательна. Повторяют оксидазные пробы на срезах сырой и вареной моркови.

Работа 37. Пероксидазы

Пероксидазы, встречающиеся особенно широко в растительных клетках, у животных находятся в крови, мышцах и молоке. Пероксидазы катализируют реакции окисления многих фенолов и аминов, причем акцептором водорода служит перекись водорода



Подобным образом дегидрируются гидрохинон, пирокатехин, пирогаллол, гваякол, крезолы, фенилендиамин, бензидин, реактив «нади», лейкосоединения 2,6-дихлорфенолиндофенола и малахитовой зеленой, но также и некоторые неорганические соединения: иодиды, с выделением иода, и нитриты. Пероксидаза окисляет также адреналин с образованием адренохрома.

Таким образом, пероксидазами окисляются, главным образом, те же субстраты, что и фенолоксидазами, с той лишь разницею, что здесь необходимо участие перекиси водорода в качестве акцептора водорода. По этой причине при всех пробах на пероксидазную активность необходима предварительная проба на оксидазный эффект, так как очень часто один и тот же реагент служит как для открытия фенолоксидаз, так и для открытия пероксидаз. Кроме перекиси водорода пероксидазами могут быть использованы в качестве акцепторов водорода и некоторые органические пероксиды.

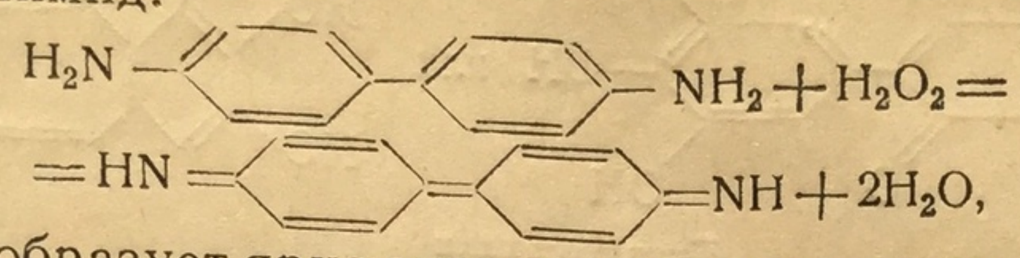
Пероксидазы представляют собою протеиды, содержащие в качестве активной группы железо-порфириновый комплекс. Вследствие этого они угнетаются HCN, H_2S, гидроксиламином, тиомочевиной. Пероксидазы угнетаются также при наличии избыточной перекиси водорода, поэтому необходимо следить за тем, чтобы такого избытка при пробах на пероксидазу не было. Пероксидазы, по сравнению с другими ферментами, довольно стойки по отношению к инактивированию нагреванием. Присутствие фермента каталазы может угнетать пероксидазную реакцию за счет разложения перекиси водорода.

Для изучения особенно активных растительных пероксидаз пользуются хорошо измельченным (на терке) хреном, смешанным с равным объемом воды или же отфильтрованным водным экстрактом.

1. Гваяковая проба. К полученной взвеси хрена или к водному экстракту добавляют одну-две капли свежеприготовленного 5%-ного спиртового раствора гваяковой смолы и убеждаются в том, что синее окрашивание не появляется, затем добавляют 1—2 капли 0,5% перекиси водорода, при этом тотчас появляется яркое синее окрашивание. Повторяют пробу с прокипяченным препаратом фермента — окрашивания не получается.

2. Бензидиновая проба. К раствору пероксидазы хрена добавляют 2—5 капель спиртового раствора бензидина и затем 1—2 капли 0,5% перекиси водорода. Тотчас появляется тем-

носинее окрашивание, обусловленное тем, что бензидин окисляется в парахинондиимид:

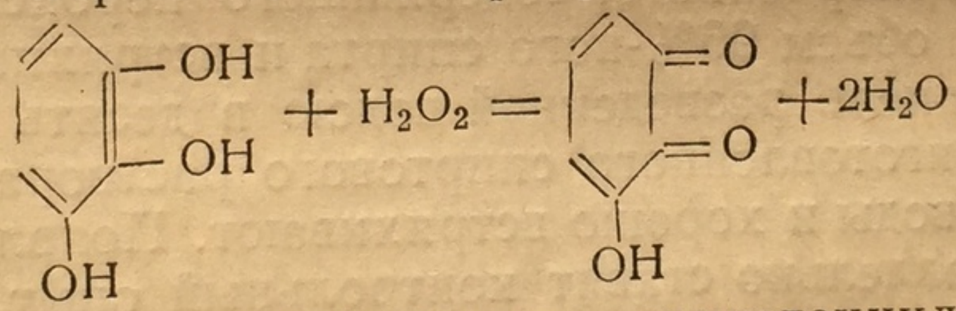


соль которого образует ярко окрашенное молекулярное соединение с неокисленным бензидином.

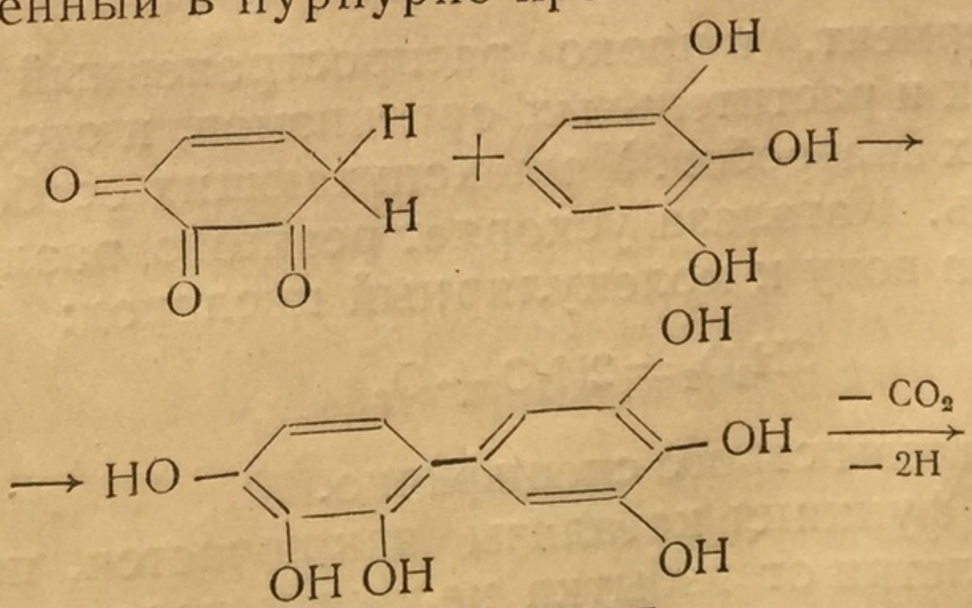
3. Проба с реактивом «нади». Добавляют к взвеси измельченного хрена в воде 2—3 капли свежеприготовленного реактива «нади» (раствор α-нафтола, диметил-*p*-фенилендиамина и Na_2CO_3) и затем 1—2 капли 0,2% раствора перекиси водорода. Тотчас появляется интенсивное синее окрашивание образующейся индофеноловой синей.

4. Проба с *p*-фенилендиамином. К взвеси хрена в воде добавляют 2 капли 2%-ного водного раствора *p*-фенилендиамина и затем 1—2 капли 0,2%-ной перекиси водорода. Тотчас появляется зеленоватое окрашивание, быстро переходящее в синевато и красновато-коричневое. Окраска обусловлена образованием молекулярного соединения *p*-хинондиимида, получающегося при окислении, с неокисленным *p*-фенилендиамином.

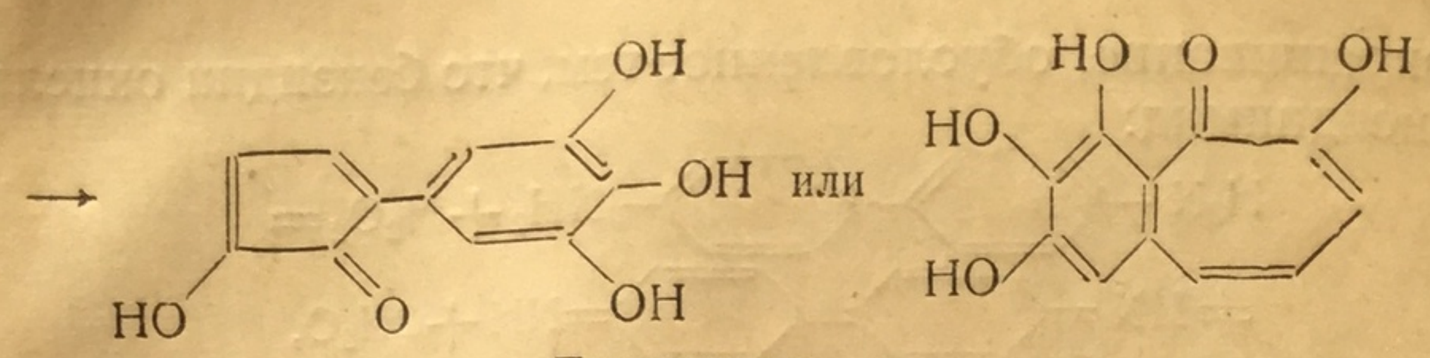
5. Пурпурогаллиновая проба. К водному экстракту из хрена или к взвеси хрена в воде добавляют 0,5 мл 0,2%-ного водного раствора пирогаллола и затем 1—2 капли 0,5%-ной перекиси водорода. Быстро появляется желтовато-оранжевое окрашивание. После некоторого стояния можно заметить образование оранжевого осадка пурпурогаллина, образующегося при окислении пирогаллола следующим путем. Вначале пирогаллол дегидрируется пероксидазой, превращаясь в нестойкий хинон:



Таутомерная форма этого хинона—трикетоциклогексен конденсируется с другой молекулой пирогаллола, образуя гексаоксидифенил, который далее окисляется с отщеплением CO_2 в пурпурогаллин, окрашенный в пурпурно-красный цвет:



Гексаоксидифенил



Пурпурогаллин

Совершенно тем же путем пирогаллол превращается в пурпурогаллин и при действии фенолоксидазы, понятно без участия перекиси водорода.

Повторяют все вышеописанные пробы с прокипяченным экстрактом хрена, причем обнаружить пероксидазное действие не удается.

Для проб на пероксидазу молока в четыре пробирки наливают по 3 мл сырого молока и в другие четыре пробирки по 3 мл предварительно прокипяченного молока. Затем проделывают гваяковую пробу, бензидиновую пробу, пробу с раствором «нади» и *p*-фенилендиамином. Во всех случаях с прокипяченным молоком пробы на пероксидазу отрицательны.

Для проб на пероксидазу мышц небольшое количество измельченной мышечной ткани извлекают равным объемом воды и отфильтровывают экстракт. С водным экстрактом делают гваяковую пробу, пробу с реактивом «нади» и бензидиновую пробу. Повторяют пробы с прокипяченным экстрактом.

Для исследования пероксидазы крови кровь разбавляют в десять раз водою и с таким раствором делают гваяковую и бензидиновую пробу и пробу с *p*-фенилендиамином. Повторяют те же пробы с предварительно прокипяченным раствором крови.

Берут 1—2 г испорченного, содержащего пероксиды, жира, добавляют равный объем 96%-ного спирта и встряхивают. Затем добавляют 4—5 капель разведенной водою в десять раз крови, 5 капель свежеприготовленного спиртового раствора гваяковой смолы и 5—10 мл воды и хорошо встряхивают. Появляется голубая окраска. Параллельно ставят контрольный опыт, в котором не добавляют раствора крови или прибавляют прокипяченный раствор крови. Окраска в контрольном опыте не появляется.

Работа 38. **Каталаза**

Каталаза — фермент, широко распространенный в клетках как животных, так и растительных организмов, и отсутствующий лишь у облигатных анаэробов. У млекопитающих особенно богаты ею кровь и печень. Каталаза ускоряет реакцию разложения перекиси водорода на воду и молекулярный кислород:

$$2H_2O_2 = 2H_2O + O_2$$

и это действие каталазы строго специфично.

Биологическая функция каталазы заключается, повидимому, в освобождении клетки от избытка перекиси водорода, образую-

щейся при многих окислительно-восстановительных процессах, как, например, при действии ксантиноксидазы, уриказы, оксидазы l-α-аминокислот, диаминооксидазы, и при ряде других ферментативных процессов. Образующаяся перекись водорода или расходуется в процессах, катализируемых пероксидазой, или же разрушается каталазой, причем образующийся кислород снова может быть использован в окислительных реакциях клетки. Таким образом, каталаза является важным элементом общей окислительно-восстановительной системы клетки.

Как и пероксидазы, каталаза представляет собою протеид, содержащий в качестве активной группы железо порфириновый комплекс (содержание в кристаллической каталазе Fe=0,12%). По некоторым данным, в молекуле каталазы, наряду с гематиновыми группами, содержится и желчнопигментная группа.

Каталаза угнетается HCN, H_2S, гидроксиламином. Она неустойчива при кислых [H·] и разрушается при pH ниже 3. Разложение перекиси водорода при действии каталазы можно представить в виде следующей схемы:

$$\left[\begin{matrix}\text{Каталаза}\\ 4Fe^{+++}\end{matrix}\right] + 2H_2O_2 = \left[\begin{matrix}\text{Каталаза}\\ 4Fe^{++}\end{matrix}\right] + 4H^{\oplus} + 2O_2$$

$$\left[\begin{matrix}\text{Каталаза}\\ 4Fe^{++}\end{matrix}\right] + 4H^{\oplus} + O_2 = \left[\begin{matrix}\text{Каталаза}\\ 4Fe^{+++}\end{matrix}\right] + 2H_2O$$

$$\text{Суммарно: } 2H_2O_2 = O_2 + 2H_2O$$

К 2 мл свежей дефибринированной крови приливают 1—2 мл 3%-ного раствора перекиси водорода. Происходит обильное выделение кислорода. При повторении опыта с прокипяченной кровью каталазное действие не наблюдается.

Небольшой кусок мышечной ткани измельчается и извлекается равным объемом воды. К водной вытяжке добавляют 3%-ную перекись водорода. Наблюдается заметное выделение кислорода. При повторении опыта после нагревания ткани с водой до кипения действие каталазы обнаружить не удается.

К 2 мл молока приливают 1 мл 3%-ного раствора перекиси водорода. Происходит выделение кислорода. При таком же опыте с прокипяченным молоком выделения кислорода не наблюдается.

Приливают небольшое количество 3%-ного раствора перекиси водорода к 2 мл картофельного сока и к 2 мл такого же сока, но предварительно прокипяченного и охлажденного. Выделение наблюдается только в первом случае.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ И АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

В основе всякого количественного определения ферментативного действия или активности действия фермента лежат те изменения, которые происходят с субстратом соответствующей ферментативной реакции. Об этих изменениях и об их скорости

можно судить либо по исчезновению исходных веществ, подвергающихся ферментативному воздействию, либо по образованию и накоплению продуктов ферментативной реакции.

Наиболее часто активность действия ферментов выражается количеством вещества, которое за строго определенное время и в строго определенных условиях опыта подверглось тому или иному изменению. Например, за единицу ферментативного действия сахаразы принимают гидролитическое расщепление 4 г тростникового сахара в 25 мл 1%-ного раствора однометалльного фосфата натрия, приводящее за 1 минуту при 15,5° к нулевому вращению, т. е. к расщеплению 75,9% сахарозы.

Ферментативное действие может быть оценено также временем, необходимым для того или иного, но строго определенного изменения субстрата ферментативной реакции в строго определенных условиях опыта. Определяемая таким образом величина обратно пропорциональна величине, характеризующей активность ферментативного действия, обычно обозначается как «показатель времени». Например, для определения активности мальтазы может служить измерение времени, необходимого для того, чтобы довести до 50% гидролиз 2,5 г гидрата мальтозы, растворенных в 50 мл фосфатного буфера с pH =6,8 при 30°.

Кроме этих двух способов активность ферментативного действия в отдельных случаях выражают константой скорости реакции, причем эта константа измеряется в строго определенных условиях опыта и в определенных пределах ферментативного изменения субстрата. Так, например, для характеристики активности амилазы может быть избрана величина, кратная константе мономолекулярной реакции:

$$K_1 = 0{,}4243K = \frac{1}{t}\log_{10}\frac{a}{a-x},$$

определяемой при ферментативном гидролизе смеси 25 мл 1%-ного раствора крахмала (0,25 г), 10 мл фосфатного буфера с pH=6,8, 1 мл 0,2 н. раствора хлористого натрия и 1 мл раствора фермента при 37° в пределах первых 40% расщепления крахмала.

Следует иметь в виду, что во всех случаях определения ферментативного действия определяется не количество фермента, а его каталитическая активность, выражаемая тем или иным способом через скорость ферментативной реакции. Активность же фермента зависит не только от его весового количества, но, при прочих равных условиях, и от наличия или отсутствия активаторов и ингибиторов и состояния самой катализируемой реакции. Поэтому единицы ферментативного действия, характеризующие активность фермента и обозначаемые часто терминами «единица фермента» или «энзимная единица», лишь с известными оговорками могут служить мерой количества фермента.

Если активность действия фермента, выраженную тем или иным способом, относить к определенному количеству исследу-

емого препарата фермента, то можно получить представление об активности данного препарата или о «концентрации фермента» в данном препарате («энзиматической силе» препарата). Активность препаратов ферментов часто выражается «энзимными числами».

Несмотря на общие для различных ферментов наименования результатов определений, никакой общей меры для действия различных ферментов не существует. Более того, все выражения активности ферментов имеют условное значение и потому для каждого отдельного фермента могут быть сравнимы лишь при строгом и точном воспроизведении условий их определения.

Следующие работы дают представление о простейших случаях определения ферментативного действия и активности ферментов.

Работа 39. **Определение амилокластической активности амилазы слюны**

Метод основан на определении наименьшей относительной концентрации фермента, достаточной для гидролиза определенного количества крахмала при избранных температуре и времени реакции. Для этого служит опыт с геометрическим рядом концентраций фермента, т. е. с рядом разведений исследуемого раствора или препарата фермента. При ориентировочных определениях и определениях, не требующих особой точности, пользуются наиболее легко приготовляемым рядом с множителем 0,5, т. е. рядом разведений в 2,4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 и 512 раз.

Концом ферментативного гидролиза крахмала считают или момент исчезновения синего окрашивания с иодом, т. е. полное расщепление крахмала до декстринов, или же момент полного исчезновения окрашивания с иодом („ахроматический пункт"), т. е. гидролиз крахмала до стадии низкомолекулярных декстринов и мальтозы.

Для определения пользуются профильтрованной слюной или предварительно разбавленной в несколько раз и также профильтрованной слюной. Затем в десяти чистых и хорошо выщелоченных паром пробирках готовят ряд разведений слюны. Для этого в первую и вторую пробирки наливают с помощью пипетки по 1 мл профильтрованной слюны. Затем во вторую пробирку приливают 1 мл воды, смешивают и 1 мл смеси переносят в третью пробирку. В третью пробирку добавляют 1 мл воды, смешивают и снова 1 мл смеси переносят в четвертую пробирку. Такую операцию продолжают далее до десятой пробирки, из которой после разведения водой 1 мл смеси удаляют. Таким путем получают ряд разведений. В первой пробирке неразведенная слюна, во второй — разведенная в два раза, в третьей — в четыре раза, в четвертой — в восемь раз, в пятой — в шестнадцать раз и т. д. Затем во все пробирки наливают по 2 мл фосфатно-цитратной буферной смеси с pH=6,8 (смесь № 24; см. работу 14) и после этого по 1 мл 1%-ного раствора

растворимого крахмала, приготовленного на 0,2%-ном растворе хлористого натрия. Все пробирки тотчас ставят в термостат при температуре 37° на 10, 20 или 30 минут. По истечении этого времени вынимают пробирки из термостата, быстро наполняют ледяной водой и погружают в сосуд с холодной водой. Прибавляют затем во все пробирки по 2—3 капли 0,2 н. раствора иода в иодистом калии и отмечают пробирку с наименьшей концентрацией слюны, в которой не появляется синее или сине-фиолетовое окрашивание. Таким образом, определяется наименьшая концентрация слюны, достаточная для полного гидролитического расщепления (до состояния декстринов, не дающих с иодом синего окрашивания) взятого количества крахмала за данное время и при данной температуре. Амилокластическая активность слюны может быть выражена числом миллилитров 1%-ного раствора крахмала, подвергающихся такому расщеплению за счет действия 1 мл исходной слюны. Она может быть вычислена следующим образом. Если, например, при опыте 30-минутной продолжительности первой окрашенной в синий цвет пробиркой оказалась шестая, то полное расщепление до принятого предела произошло в пятой пробирке, т. е. пробирке, где слюна разведена в 16 раз. Так как 1 мл такой слюны расщепляет 1 мл 1%-ного раствора крахмала, то 1 мл неразведенной слюны должен расщеплять 1%-ного раствора крахмала $1 \times 16 = 16$ мл. Другими словами, диастатическая или амилокластическая активность слюны, обозначаемая буквой D, для данного случая будет:

$$D_{30'}^{37^\circ} = 16$$

Точность такого определения очень невелика, так как относительные концентрации фермента в двух соседних пробирках различаются ровно в два раза, а поэтому и ближайшие два результата определения отличаются также в два раза. Следовательно, истинное значение для активности в приведенном примере лежит между величинами 16 и 32.

Для того, чтобы повысить точность определения, необходимо составить дополнительный геометрический ряд разведений, члены которого заполнили бы интервал, лежащий между концентрацией в пробирке, где обнаружено полное расщепление (в рассматриваемом случае 1/16; пробирка пятая) и ближайшей меньшей концентрацией, при которой не наблюдалось полного расщепления (в рассматриваемом случае 1/32; пробирка шестая). С этой целью составляют геометрический ряд разведений с множителем 0,9, беря за исходный раствор фермента, разведенный в шестнадцать раз (пятая пробирка). При этом можно ограничиться составлением только следующих восьми растворов с концентрациями 1,00; 0,900; 0,810; 0,729; 0,656; 0,590; 0,531; 0,478, так как последний член такого ряда уже имеет концентрацию более низкую, чем соответствующий ближайший член первого геометрического ряда с множителем 0,5.

К 1 мл исследуемой слюны прибавляют 15 мл воды и перемешивают. Таким образом, получают слюну, разведенную в шестнадцать раз. Затем берут восемь чистых пробирок и помещают в первую пробирку 1 мл разведенной в шестнадцать раз слюны, а в остальные по 1 мл воды. После этого во вторую пробирку вносят 9 мл разведенной в шестнадцать раз слюны, перемешивают и 9 мл полученного раствора переносят в третью пробирку, откуда снова после смешивания переносят 9 мл раствора в четвертую пробирку, и т. д. Из последней восьмой пробирки 9 мл жидкости выбрасывают. Таким образом, получают следующий геометрический ряд относительных концентраций фермента: первая пробирка — 1/16, вторая — 1/16×0,9, третья — 1/16×0,81, и т. д.

Теперь в каждую пробирку отмеривают по 2 мл цитратно-фосфатной буферной смеси с pH=6,8 и затем по 1 мл 1%-ного раствора крахмала, приготовленного на 0,2% растворе хлористого натрия. Все пробирки тотчас ставят в термостат при 37° на 30 минут и затем находят пробирку, в которой произошло полное расщепление крахмала, как это уже описано. Если, например, при этом такой пробиркой оказалась третья, то очевидно, что амилокластическая активность слюны будет:

$$D_{30'}^{37^\circ} = 20$$

Работа 40. **Определение активности химозина**

Для определения употребляют или свежее молоко, или прокипяченное молоко, к которому добавлено 0,1 объема 10%-ного раствора хлористого кальция, или же, наконец, искусственное молоко, при работе с которым результаты получаются более постоянными и сравнимыми. Последнее готовят, растворяя 10 г молочного порошка в 100 мл дестиллированной воды при 50° и по охлаждении добавляют 1 мл 10%-ного раствора хлористого кальция.

Берут десять пробирок и в первую помещают 1 мл разведенного в десять раз раствора сычужного фермента (см. работу 31)и 1 мл воды. Переносят из первой пробирки во вторую 1 мл и добавляют 1 мл воды. Снова из второй пробирки переносят 1 мл в третью и добавляют 1 мл воды. Продолжая такое разведение фермента до десятой пробирки (в которой оставляют 1 мл, а 1 мл выбрасывают), получают геометрический ряд разведений, т. е. разведения в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 и т. д. раз. В одиннадцатую пробирку, которая служит в качестве контрольной, вносят 1 мл воды. Теперь во все пробирки наливают по 10 мл молока и помещают в термостат на 20 минут при 35°. Отмечают наименьшую концентрацию фермента, которая оказалась достаточной для того, чтобы вызвать свертывание, и определяют активность в сычужных единицах, т. е. вычисляют количество миллилитров молока, которое могло бы быть при данных условиях свернуто 1 мл неразведенного фермента. Например, если молоко свернулось в первых пяти пробирках,

а в остальных, начиная с шестой, молоко осталось жидким, то при данных условиях 10 мл молока свертываются 1 мл фермента, разведенного в 320 раз, а 1 мл неразведенного фермента может свернуть 3200 мл молока. Следовательно, активность данного сычужного фермента равна 3200 сычужным единицам.

Работа 41. **Определение активности тромбина (фибрин-фермента)**

Этот метод, как и предыдущие, основан на определении с геометрическим рядом разведений фермента. В качестве раствора тромбина служит свежая сыворотка крови, а раствором фибриногена служит инактивированная нагреванием свежая магнезиальная плазма. Для получения такой плазмы 3 мл свежевыпущенной крови смешивают с 1 мл 28%-ного раствора сернокислого магния и центрифугируют. Прозрачную плазму отбирают пипеткой и помещают на 30 минут в термостат при 50—60°. Для определений употребляют такую плазму, разведенную в пять раз.

Берут десять пробирок и во все пробирки, кроме первой, наливают по 1 мл 1% хлористого натрия. Затем в первую и вторую пробирки наливают по 1 мл свежей неразведенной сыворотки (раствор тромбина). Содержимое второй пробирки смешивают и 1 мл смеси переносят пипеткой в третью пробирку. Содержимое третьей пробирки также перемешивают и снова 1 мл смеси переносят в четвертую пробирку. Такую операцию продолжают далее до десятой пробирки, из которой после перемешивания 1 мл смеси удаляют. Таким путем получают геометрический ряд разведений тромбина. Затем в одиннадцатую пробирку (контрольную) помещают 1 мл 1%-ного раствора хлористого натрия. Теперь во все 11 пробирок наливают по 1 мл плазмы (раствор фибриногена) и ставят все пробирки в холодильный шкаф при +5° на 24 часа. По окончании опыта определяют ту минимальную концентрацию тромбина, при которой еще наблюдается хотя бы незначительное свертывание. В контрольной пробирке свертывание не должно наблюдаться.

Активность тромбина выражают количеством миллилитров плазмы, свертываемой 1 мл неразведенной сыворотки. Если, например, свертывание наблюдалось в первых восьми пробирках, а в девятой и десятой пробирках свертывание не произошло, то количество фибриногена, содержащееся в 1 мл плазмы, скоагулировало 1 мл сыворотки, разведенной в 128 раз. Следовательно, 1 мл неразведенной сыворотки свертывает 128 мл плазмы. Таким образом, активность тромбина равна 128 единицам. В норме активность тромбина сыворотки от 64 до 256 единиц.

Работа 42. **Определение активности пепсина по Метту**

Простой метод определения активности протеаз был разработан С. Меттом в лаборатории академика Ивана Петровича Павлова.

Этот метод особенно часто применяется при определении активности пепсина.

Смешивают несколько белков куриного яйца и фильтруют через марлю. Наполняют белком тонкостенные стеклянные трубки диаметром 1—2 мм и коагулируют белок в трубках погружением их в воду, нагретую до 85°. Свернувшийся белок должен совершенно равномерно заполнять трубку.

В исследуемый раствор пепсина или в исследуемый желудочный сок опускают несколько кусков трубки по 20 мм длиной. Ставят в термостат на 10 часов при температуре 37°. После этого с помощью лупы измеряют с обоих концов каждой трубки длину переваренного столбика белка. Из всех определений находят среднее арифметическое. Так как согласно правилу, найденному Борисовым, количество расщепленного белка x, прямо пропорционально корню квадратному из количества F, употребленного для переваривания пепсина:

$$x = K\sqrt{F},$$

то пептическую активность находят, возводя найденную среднюю длину переваренного столбика в квадрат. Например, если в среднем сумма переваренных с двух концов трубки столбиков равна 3 мм, то активность пептического действия равна 9.

Работа 43. Определение активности каталазы по Баху и Зубковой

Активность каталазы может быть выражена количеством миллиграмм перекиси водорода, разрушенной за определенное время и при определенных условиях опыта. Для определения перекиси водорода может служить титрование ее раствором перманганата в кислой среде. Реакция протекает по уравнению:

$$2KMnO_4 + 5H_2O_2 + 3H_2SO_4 = 2MnSO_4 + K_2SO_4 + 8H_2O + 5O_2$$

В небольшой стаканчик наливают точно 20 мл дестиллированной воды. Затем добавляют при помощи пипетки 0,02 мл крови и несколько раз ополаскивают пипетку насасыванием жидкости. Таким образом получают кровь, разведенную в 1 000 раз.

Берут четыре конические колбы емкостью по 50 мл и наливают в каждую по 7 мл дестиллированной воды. Затем в две колбы прибавляют по 1 мл разведенной в 1 000 раз крови, а в две других — по 1 мл той же крови, но предварительно прокипяченной. Теперь наливают во все четыре колбы по 2 мл 1%-ного раствора химически чистой перекиси водорода и ставят в термостат при 18° ровно на 30 минут. Через 30 минут во все колбы наливают по 3 мл 10%-ной серной кислоты для прекращения действия каталазы и для подкисления раствора перед титрованием и затем титруют 0,1 н. раствором перманганата до появления светлорозового окрашивания, не исчезающего в течение полминуты.

В первых двух колбах титруется оставшаяся неразрушенной перекись водорода, а в двух последних (контроль)— все количество перекиси водорода, взятой для опыта. Поэтому количество разрушенной перекиси может быть найдено по разности между двумя этими титрованиями. Например, если на титрование в опыте в среднем из двух определений пошло 3,0 мл 0,1 н. раствора перманганата, а на титрование контрольных колб пошло 8,0 мл, то количество разрушенной каталазой перекиси водорода соответствует 5,0 мл 0,1 н. раствора перманганата. Как следует из приведенного выше уравнения, 1 мл 0,1 н. раствора перманганата эквивалентен 1,7 мг перекиси водорода. Следовательно, каталазное действие 1 мл разведенной в 1 000 раз крови равно $1,7 \times 5 = 8,5$ мг разложенной перекиси водорода, а каталазное действие 1 мл исходной крови $8,5 \times 1\,000 = 8\,500$ мг.

ГЛАВА IV

УГЛЕВОДЫ

> «Все живое вещество (совокупность живых организмов биосферы) в конечном итоге в значительной части своей массы происходит из угольной кислоты атмосферы или угольной кислоты, растворенной в воде, так как это единственные источники, из которых оно извлекает потребный ему углерод».
>
> *В. И. Вернадский.*

Под названием углеводов, или глюцидов, известна обширная группа естественных соединений. Эта группа природных соединений может быть подразделена на 1) моносахариды или монозы, 2) олигосахариды, или кристаллические полисахариды (дисахариды, трисахариды, тетрасахариды) и 3) полисахариды, или полиозы,— высокомолекулярные углеводы с коллоидными свойствами.

Простейшие углеводы — моносахариды — представляют собой соединения со смешанной функцией, содержащие одновременно гидроксильные и карбонильные группы (окси-оксосоединения) и образующие таутомерные формы циклических полуацеталей. В зависимости от характера карбонильной группы различают альдозы (оксиальдегиды) и кетозы (оксикетоны).

Олигосахариды — полные ацетали, образующиеся с выделением воды из двух или нескольких молекул моносахаридов. При этом молекула воды выделяется или за счет спиртового гидроксила одной молекулы и гидроксила таутомерной формы карбонильной группы (глюкозидного гидроксила) другой молекулы моносахарида, или же за счет гидроксилов таутомерных форм карбонильной группы двух молекул моносахарида. Таким образом, по своему строению они являются глюкозидами или глюкозидо-глюкозидами. Олигосахариды сравнительно легко гидролизуются с образованием соответствующих моносахаридов. Они дают настоящие, а не коллоидальные растворы, обладают подобно монозам сладким вкусом и обычно хорошо кристаллизуются.

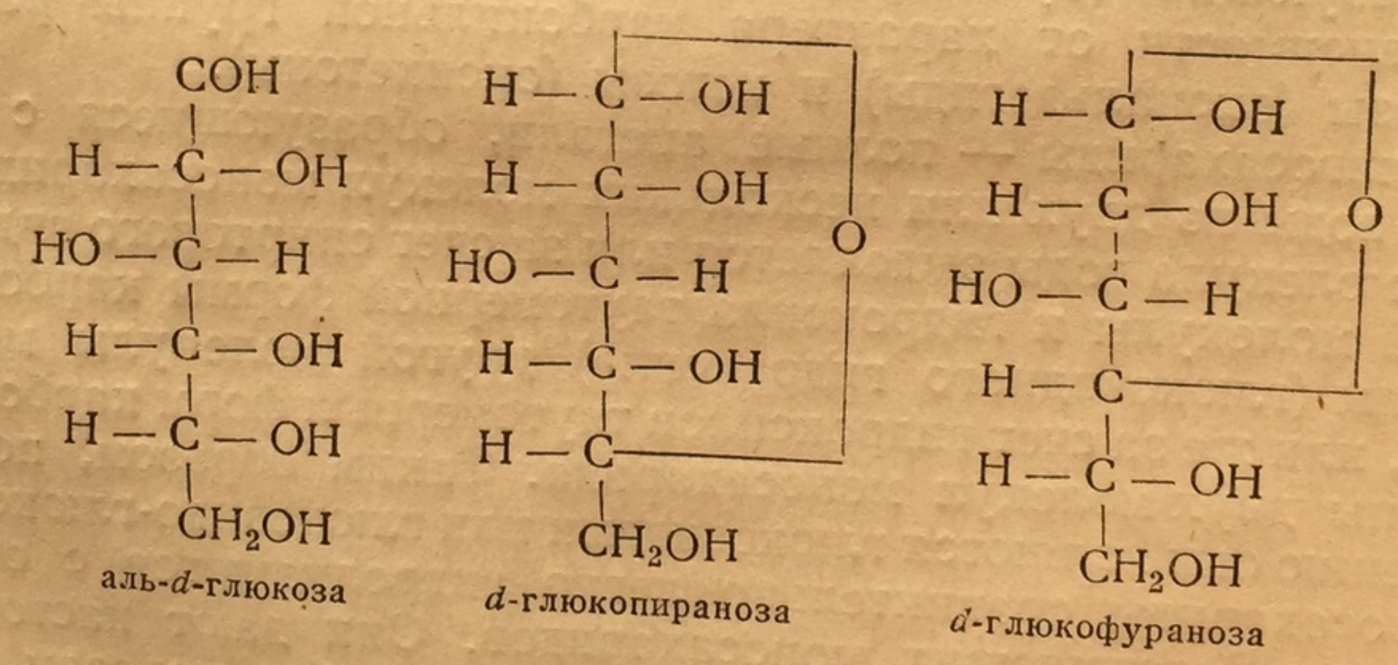
Полисахариды построены также, как и олигосахариды, но из многих молекул моносахаридов. Поэтому они отличаются высоким молекулярным весом, в большинстве нерастворимы в воде или дают коллоидальные растворы, аморфны (криптокристалличны). Полисахариды не обладают сладким вкусом. При гидролизе они

дают в качестве промежуточных продуктов гидролиза олигосахариды, а в качестве конечных продуктов — моносахариды.

Углеводы важны как по своей роли в процессах обмена веществ, так и в качестве компонентов структуры многих естественных соединений, как, например, нуклеопротеидов, глюкопротеидов, повидимому, большинства белков, некоторых витаминов и коэнзимов. Углеводы являются конечными продуктами фотохимического синтеза у автотрофных зеленых растений. Этим путем зеленые растения используют энергию солнечного света и накопляют ее в виде химической энергии образующихся при фотосинтезе углеводов. У животных и вообще гетеротрофов, лишенных способности к подобной аккумуляции солнечной энергии, энергия, необходимая для осуществления процессов синтеза, связанных с повышением химического потенциала, черпается за счет сопряженных с процессами синтеза окислительных реакций. Такая энергетическая компенсация у гетеротрофов возможна только потому, что они заимствуют из внешней среды соединения с достаточно большим запасом свободной энергии, которые образуются в конечном итоге за счет аккумуляции энергии солнечного света при фотосинтезе углеводов зелеными растениями.

Изучению процесса фотосинтеза и выяснению его роли для существования всех живых организмов на земле посвящены классические исследования нашего известного биолога К. А. Тимирязева.

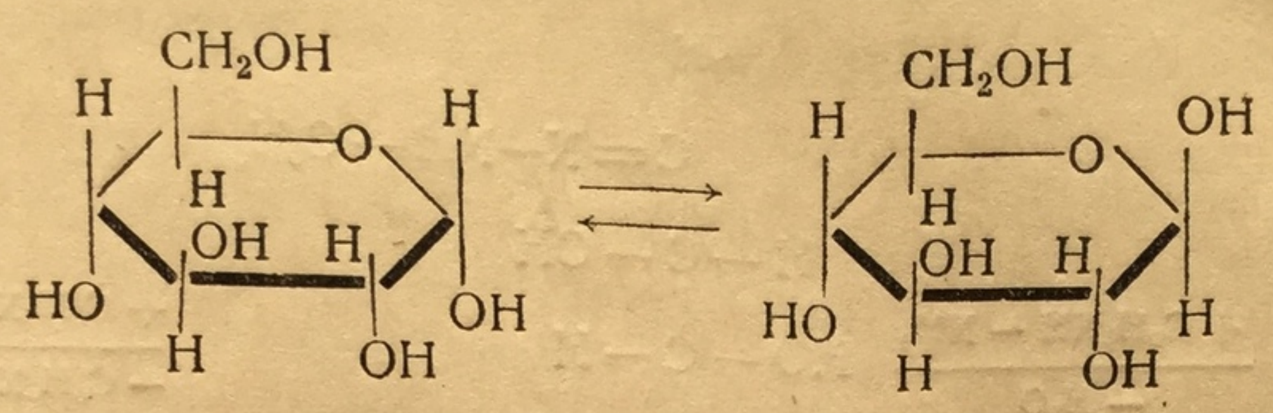
Работа 44. *d*-(+)-Глюкоза (декстроза, виноградный сахар)



Глюкоза—одно из широко распространенных естественных соединений и одно из важнейших сахаристых веществ. Глюкоза является структурным элементом при построении молекул многих олигосахаридов и важнейших полисахаридов, таких, как гликоген, крахмал, клетчатка (целлюлоза).

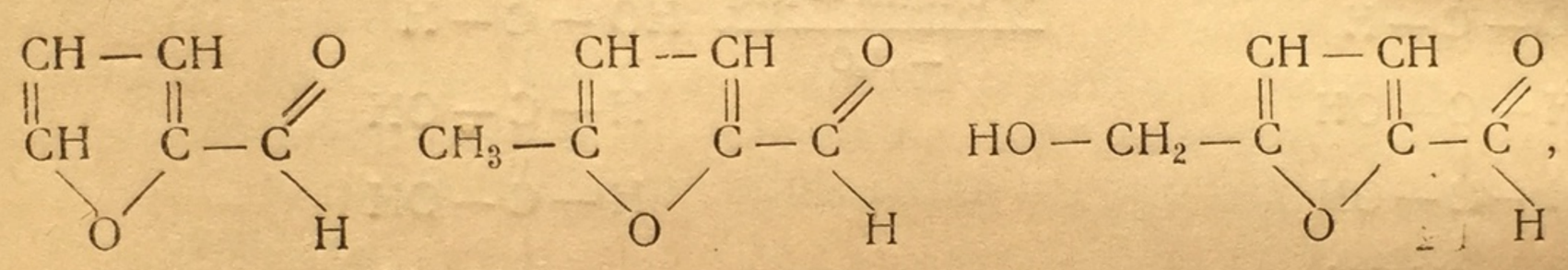
Глюкоза — редуцирующий сахар. В растворах глюкоза обнаруживает мутаротацию, как следствие взаимного превращения,

до достижения равновесия α- и β-форм:



Конечное $[\alpha]_D^{20°} = +52{,}5°$. С фенилгидразином дает *d*-глюкозазон. Легко сбраживается дрожжами под действием комплекса ферментов дрожжевых клеток («зимазы»).

1. Проба Подобедова-Молиша. Эта реакция является общей для углеводов. Основана она на том, что при действии концентрированной серной кислоты из пентоз получается фурфурол, из метилпентоз — метилфурфурол, а из гексоз — ω-оксиметилфурфурол:



которые конденсируются с α-нафтолом, образуя окрашенные соединения.

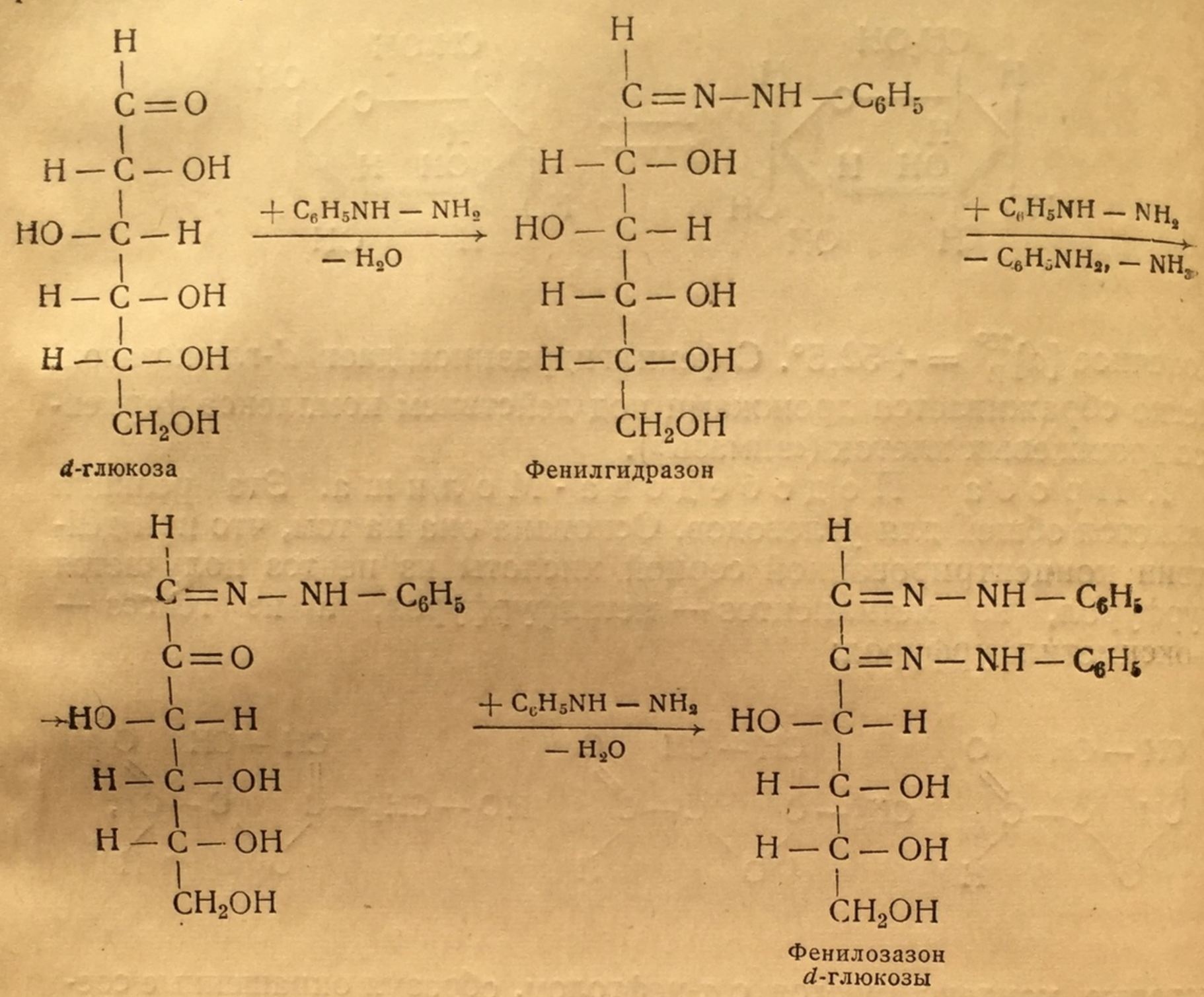
К 1 мл 1—2%-ного раствора глюкозы добавляют 1—2 капли 10%-ного алкогольного раствора α-нафтола и смесь переслаивают концентрированной серной кислотой. На границе двух слоев появляется фиолетовоокрашенное кольцо. Если вместо α-нафтола взять раствор тимола, то образуется красное кольцо.

2. Проба на образование альдегидных смол. Реакция основана на общей для альдегидов склонности к образованию в щелочной среде продуктов конденсации (альдегидные смолы).

5 мл раствора глюкозы (1—2%-ного) смешивают с 2 мл 10%-ного раствора едкого натра и нагревают до кипения. Жидкость желтеет, затем делается бурой и, наконец, темнобурой. Появляется запах карамели, особенно заметный при подкислении раствора.

3. Получение озазона. При действии фенилгидразина на альдозы и кетозы образуются гидразоны. В этих соединениях соседний с карбонильной группой углеродный атом окисляется второй молекулой фенилгидразина до $>CO$ группы, а третья молекула фенилгидразина присоединяется по месту новой карбонильной группы, образуя озазон. Реакция может быть изоб-

ражена следующим образом:



d-глюкоза

Фенилгидразон

Фенилозазон *d*-глюкозы

1 г глюкозы растворяют в 20 мл воды, добавляют 3 г уксуснокислого натрия и затем 2 г хлоргидрата фенилгидразина. Раствор нагревают на водяной бане около двух часов. При этом выпадают желтые кристаллы озазона. По охлаждении жидкости их отфильтровывают и перекристаллизовывают из горячего водного алкоголя. Получают светложелтые иголочки *d*-глюкозазона с температурой плавления 204—205°.

d-глюкоза, d-манноза и d-фруктоза дают один и тот же озазон, что весьма важно в смысле установления их строения.

Работа 45. Восстановительная способность глюкозы (реакции восстановления)

Все углеводы, обладающие свободной карбонильной группой (свободным глюкозидным гидроксилом), дают ряд характерных реакций, основанных на окислении этой группы за счет восстановления некоторых слабых окислителей: окисей меди, серебра и др. Сахара, дающие такие реакции, носят название редуцирующих в противоположность нередуцирующим углеводам, не содержащим свободной карбонильной группы. С увеличением молекулярного веса редуцирующая способность падает и полисахариды, даже

имеющие свободную карбонильную группу, практически не редуцируют. Реакции восстановления (окисления сахаров) протекают легко в щелочной среде и труднее в нейтральной и особенно кислой среде.

Проба на восстановление окиси меди. К раствору глюкозы (1—2%) прибавляют половину объема 10%-ного раствора едкого натра и затем несколько капель раствора сернокислой меди. Нагревают до кипения. Вначале образуется желтый осадок гидрата закиси меди (CuOH), который при дальнейшем нагревании переходит в красный осадок закиси меди (Cu_2O).

Проба Фелинга. Реактив Фелинга готовят, смешивая равные объемы раствора медного купороса (69,28 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ в 1 000 мл воды) и щелочного раствора сегнетовой соли (346 г $C_4H_4O_6KNa.\ 4H_2O$ и 140 г NaOH в 1 000 мл воды). 3 мл полученного раствора Фелинга приливают к 9 мл 1%-ного раствора глюкозы и нагревают до кипения. Выделяется красный осадок закиси меди (Cu_2O).

Проба с реактивом, содержащим соль висмута. Реактив совершенно аналогичен реактиву Фелинга, только вместо соли окиси меди содержит соль висмута. При нагревании до кипения раствора глюкозы с равным объемом раствора 4 г сегнетовой соли и 2 г основного азотнокислого висмута в 100 мл 10%-ного едкого натра образуется черный осадок металлического висмута.

Проба на восстановление аммиачного раствора серебра. При нагревании 4 мл раствора глюкозы в 2 мл аммиачного раствора серебра на стенках пробирки выделяется зеркало металлического серебра.

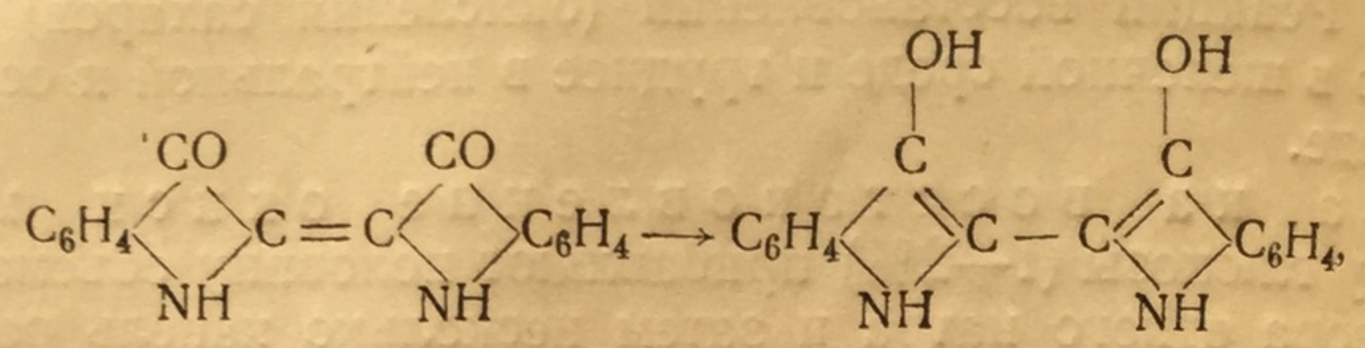
Аммиачный раствор серебра готовят путем добавления к 5%-ному раствору азотнокислого серебра необходимого количества аммиака до растворения выпадающего вначале буроватого осадка:

$$Ag_2O + 4NH_3 + H_2O = 2[Ag(NH_3)_2]OH$$

Проба Барфёда. При кипячении 1%-ного раствора глюкозы с реактивом Барфёда (раствор уксуснокислой меди и уксуснокислого натрия в разбавленной уксусной кислоте) выпадает красный осадок закиси меди. Проба Барфёда отличается от всех предыдущих реакций восстановления тем, что окисление сахара протекает не в щелочной среде, а в среде, близкой к нейтральной. В этих условиях редуцирующие дисахариды, в противоположность моносахаридам, практически не окисляются. Таким образом, такие дисахариды не восстанавливают реактив Барфёда, что позволяет отличать их от моносахаридов.

Проба на восстановление индиго. 1—2%-ный раствор глюкозы слегка подщелачивают несколькими каплями раствора соды, прибавляют 1—2 капли раствора индиго и нагревают. При этом синий цвет переходит в желтый. По охлаждении и встряхивании жидкость снова приобретает голубую окраску.

Эта проба основана на восстановлении синего индиго в белое индиго



которое кислородом воздуха снова окисляется в синее индиго.

Работа 46. Определение угла вращения плоскости поляризации и удельного вращения *d*-глюкозы

Большинство естественных соединений, образующихся в растительных и животных организмах, являются оптически активными, т. е. вращают плоскость поляризации проходящего через них или через их растворы луча поляризованного света. Причина оптической активности заключается в асимметричном строении молекул вещества. Асимметричное строение обусловлено обычно наличием одного или нескольких асимметричных атомов углерода и значительно реже, как, например, у инозита (гексаоксициклогексана), асимметрией молекулы в целом. Вращение может быть правым (по часовой стрелке) и обозначается знаком плюс (+) или левым (против часовой стрелки) и обозначается знаком минус (—).

Для характеристики вращающей способности вещества служит величина так называемого удельного вращения. Удельное вращение для вещества, находящегося в растворе, может быть выражено формулой:

$$[\alpha]=\frac{\alpha\cdot 100}{l\cdot c},$$

где: α — наблюдаемый угол вращения, l — толщина слоя жидкости (длина трубки) в дециметрах, а c — концентрация вещества в граммах в 100 мл раствора. Удельное вращение может быть выражено и так:

$$[\alpha]=\frac{\alpha\cdot 100}{l\cdot p\cdot d}.$$

Здесь p — процентное содержание, т. е. число грамм вещества в 100 г раствора, а d — плотность раствора.

Удельное вращение зависит от условий опыта. Прежде всего удельное вращение является функцией температуры и длины волны (λ) луча света. Поэтому измерения удельного вращения необходимо вести при монохроматическом свете определенной длины волны и при определенной температуре. Обычно измерения ведут в свете желтого натриевого пламени (λ=5 893 Å) и при температуре 20°. Поэтому и удельное вращение получает обозначение $[\alpha]_D^{20°}$. Кроме этого, удельное вращение зависит от природы раст-

ворителя и концентрации c исследуемого вещества. Сравнению могут подлежать лишь величины удельного вращения, найденные в одном и том же растворителе. Влияние концентрации c обычно не очень велико, однако при точных измерениях с ним приходится считаться. Так, например, для d-глюкозы в 10%-ном водном растворе в состоянии равновесия $[\alpha]_D^{20°} = +52{,}74°$, а в 1—4%-ных растворах $[\alpha]_D^{20°} = +52{,}52°$. Зависимость $[\alpha]_D$ от концентрации для d-глюкозы может быть выражена следующей формулой:

$$[\alpha]_D^{20°} = +52{,}5 + 0{,}018796p + 0{,}00051683p^2,$$

где p — процентное содержание глюкозы в растворе.

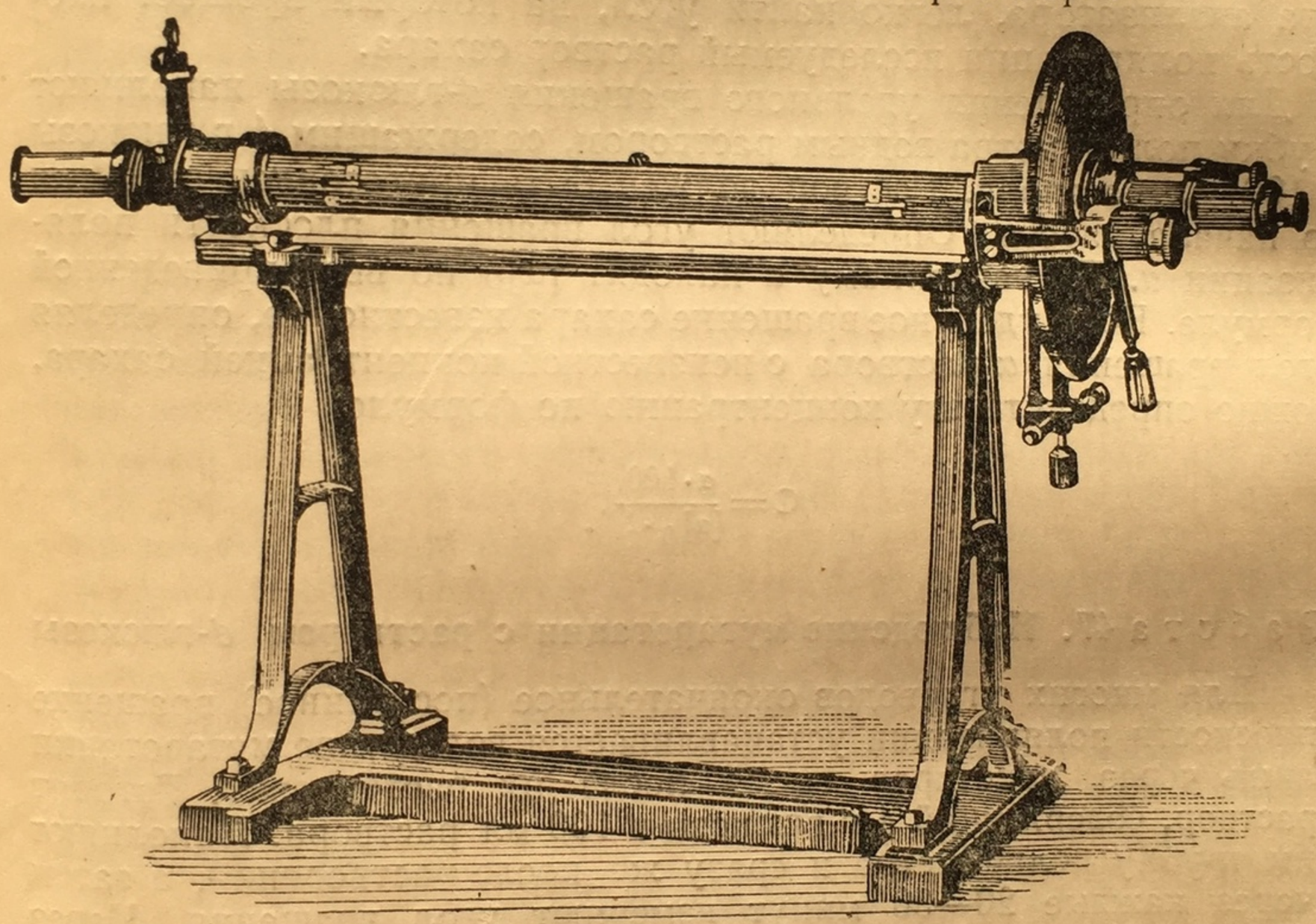


Рис. 8. Поляриметр.

Для практического определения вращающей способности служат поляриметры различных систем. Наиболее широко применяются полутеневые поляризационные приборы (рис. 8). Источником света служит натриевое пламя, свет которого фильтруется через 6—9%-ный раствор $K_2Cr_2O_7$. В качестве светофильтра может также служить раствор, содержащий 6% $K_2Cr_2O_7$ и 4% $CuSO_4$.

Прежде всего определяют нулевое положение прибора. Помещают между поляризатором и анализатором трубку, наполненную водой, и, вращая анализатор, добиваются некоторого среднего одинакового полутеневого освещения обеих половин поля зрения. Установку производят, подходя к точке равной освещенности обеих

половин поля зрения один раз справа, другой раз — слева. Берут среднее из полученных значений. Угол поворота анализатора считается по большому кругу с делениями и нониусом. Таким образом, отсчет может быть сделан с точностью до 0,01°. После этого наливают в трубку исследуемый раствор сахара. При этом следят за тем, чтобы в трубке не осталось пузырьков воздуха и чтобы боковые стекла были не слишком туго прижаты (во избежание двойного лучепреломления). Помещают трубку в поляриметр и определяют угол поворота анализатора, необходимый для достижения равномерного освещения обеих половин поля зрения, совершенно так же, как при определении нулевого положения прибора. Теперь, зная нулевое положение прибора и угол поворота анализатора, легко найти угол, на который вращает плоскость поляризации исследуемый раствор сахара.

Для определения удельного вращения *d*-глюкозы наполняют трубку поляриметра водным раствором, содержащим 4 г глюкозы в 100 мл раствора. Раствор должен быть приготовлен за сутки до начала работы. Определяют угол вращения плоскости поляризации α. По найденному α находят $[\alpha]_D$ по вышеприведенной формуле. Если удельное вращение сахара известно, то, определяя угол вращения α раствора с неизвестной концентрацией сахара, можно определить эту концентрацию по формуле:

$$C = \frac{\alpha \cdot 100}{[\alpha]_D \cdot l}.$$

Работа 47. **Наблюдение мутаротации с раствором *d*-глюкозы**

Для многих углеводов окончательное (постоянное) вращение плоскости поляризации устанавливается вследствие мутаротации лишь через некоторое время после их растворения. Готовят раствор, содержащий 4 г глюкозы в 100 мл раствора. Наполняют им трубку поляриметра и сразу же после растворения, а затем через каждые 20—30 минут измеряют угол вращения. Через несколько часов оставляют раствор на 20—25 часов и снова два-три раза измеряют угол вращения, который теперь остается постоянным. Сравнивают полученные в продолжение опыта значения для $[\alpha]_D$.

Свежерастворенная *d*-глюкоза обнаруживает удельное вращение $[\alpha]_D^{20°} \cong +111 - 113°$, которое постепенно уменьшается до $[\alpha]_D^{20°} \cong +52{,}5°$ (состояние равновесия α- и β форм *d*-глюкозы).

Работа 48. **Определение глюкозы по Фелингу**

Большинство методов количественного определения глюкозы основано на реакциях ее окисления и, следовательно, могут быть применены и для определения других редуцирующих моно- и дисахаридов. Реакции окисления сахаров в щелочной среде.

однако, не протекают в стехиометрических соотношениях. Обычно имеет место сложный окислительный распад молекулы сахара, приводящий к образованию ряда продуктов окисления. Так, например, окисление глюкозы раствором Фелинга дает среди продуктов окисления молочную, тартроновую, глюконовую и глюкуроновую кислоты. В таких случаях: 1) результаты определений не могут быть вычислены по какому-либо стехиометрическому уравнению, а вычисляются по заранее эмпирически найденным величинам и 2) для получения сравнимых результатов необходимо строго придерживаться определенных условий методики работы. Для определения заранее готовят два раствора.

I. 69.28 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ в 1000 мл воды.

II. 346 г сегнетовой соли ($C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$) и 140 г едкого натра в 1000 мл воды.

Перед самым употреблением смешивают равные объемы этих растворов и получают готовый для определения раствор Фелинга. 1,0 мл такого раствора соответствует 0,005 г окисляемой глюкозы.

В коническую колбу отмеривают точно 20 мл раствора Фелинга, добавляют 80 мл воды, нагревают на сетке до кипения и постепенно из бюретки прибавляют приблизительно 0,5%-ный раствор глюкозы. Легкое кипение поддерживают во все время приливания раствора сахара. Прибавление раствора сахара продолжают до полного исчезновения голубой окраски раствора, т. е. до полного восстановления всей соли окиси меди. Так как исчезновение последних следов голубой окраски бывает плохо заметно, то дополнительной индикаторной пробой может служить проба на присутствие в жидкости соли окиси меди. Для этой пробы берут каплю жидкости на молочнобелое стекло, подкисляют уксусной кислотой и прибавляют каплю 10%-ного раствора железистосинеродистого калия. В присутствии соли окиси меди получается коричневое пятно, благодаря образованию железистосинеродистой соли окиси меди:

$$K_4Fe(CN)_6 + 2CuSO_4 = 2K_2SO_4 + Cu_2Fe(CN)_6$$

Если для полного обесцвечивания 20 мл раствора Фелинга пошло 40 мл исследуемого раствора глюкозы, то в 100 мл раствора глюкозы содержится:

$$\frac{0{,}005 \cdot 20 \cdot 100}{40} = 0{,}25 \text{ г}$$

Работа 49. **Определение глюкозы по Бертрану**

Этот метод основан на окислении сахара избытком раствора Фелинга. Образующуюся при этом закись меди отделяют и окисляют солью окиси железа:

$$Cu_2O + Fe_2(SO_4)_3 + H_2SO_4 = 2CuSO_4 + 2FeSO_4 + H_2O$$

При этом образуется эквивалентное количество закисной соли

железа, которое определяется титрованием с перманганатом:

$$10FeSO_4 + 2KMnO_4 + 8H_2SO_4 = \\ = 5Fe_2(SO_4)_3 + K_2SO_4 + 2MnSO_4 + 8H_2O$$

По количеству израсходованного 0,1 н. раствора перманганата легко найти количество меди, так как из написанных уравнений следует, что 1 мл 0,1 н. раствора $KMnO_4$ соответствует 6,36 мг Cu. Дальнейший пересчет найденного количества меди в мг глюкозы обычным путем невозможен ввиду того, что окисление сахара солью окиси меди не следует определенному стехиометрическому соотношению. Поэтому найденное количество меди переводится в мг глюкозы по нижеследующей, эмпирически найденной, табл. 8.

Таблица 8

Таблица для способа Бертрана

Глюкоза

Глюкоза мг	Медь мг	Глюкоза мг	Медь мг	Глюкоза мг	Медь мг	Глюкоза мг	Медь мг
10	20,4	33	64,6	56	105,8	79	144,5
11	22,4	34	66,5	57	107,6	80	146,1
12	24,3	35	68,3	58	109,3	81	147,7
13	26,3	36	70,1	59	111,1	82	149,3
14	28,3	37	72,0	60	112,8	83	150,9
15	30,2	38	73,8	61	114,5	84	152,5
16	32,2	39	75,7	62	116,2	85	154,0
17	34,2	40	77,5	63	117,9	86	155,6
18	36,2	41	79,3	64	119,6	87	157,2
19	38,1	42	81,1	65	121,3	88	158,8
20	40,1	43	82,9	66	123,0	89	160,4
21	42,0	44	84,7	67	124,7	90	162,0
22	43,9	45	86,4	68	126,4	91	163,6
23	45,8	46	88,2	69	128,1	92	165,2
24	44,7	47	90,0	70	129,8	93	166,7
25	49,6	48	91,8	71	131,4	94	168,3
26	51,5	49	93,6	72	133,1	95	169,8
27	53,4	50	95,4	73	134,7	96	171,4
28	55,3	51	97,1	74	136,3	97	173,1
29	57,2	52	98,9	75	137,9	98	174,6
30	59,1	53	100,6	76	139,6	99	176,2
31	60,9	54	102,3	77	141,2	100	177,8
32	62,8	55	104,1	78	142,8		

Если по способу Бертрана определяется не глюкоза, а другой сахар, то необходимо пользоваться специальной таблицей, найденной для этого сахара.

Для работы необходимы следующие растворы:

I. 40 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ в 1000 мл воды.

II. 200 г сегнетовой соли и 150 г едкого натра в 1 000 мл воды.

III. 50 г $Fe_2(SO_4)_3$ и 200 мл концентрированной серной кислоты в 1 000 мл воды. Этот раствор не должен содержать $Fe^{\cdot\cdot}$. Поэтому

к нему добавляют 0,1 н. раствор $KMnO_4$ до очень слабой розовой окраски.

IV. 0,1 н. или 0,2 н. раствор $KMnO_4$.

Таблица 9

Таблица для способа Бертрана

Мальтоза

Мальтоза мг	Медь мг	Мальтоза мг	Медь мг	Мальтоза мг	Медь мг	Мальтоза мг	Медь мг
10	11,2	33	36,5	56	61,4	79	86,1
11	12,3	34	37,6	57	62,5	80	87,2
12	13,4	35	38,7	58	63,5	81	88,3
13	14,5	36	39,8	59	64,6	82	89,4
14	15,6	37	40,9	60	65,7	83	90,4
15	16,7	38	41,9	61	66,8	84	91,5
16	17,8	39	43,0	62	67,9	85	92,6
17	18,9	40	44,1	63	68,9	86	93,7
18	20,0	41	45,2	64	70,0	87	94,8
19	21,1	42	46,3	65	71,1	88	95,8
20	22,2	43	47,4	66	72,2	89	96,9
21	23,3	44	48,5	67	73,3	90	98,0
22	24,4	45	49,5	68	74,3	91	99,0
23	25,5	46	50,6	69	75,4	92	100,1
24	26,6	47	51,7	70	76,5	93	101,1
25	27,7	48	52,8	71	77,6	94	102,2
26	28,9	49	53,9	72	78,6	95	103,2
27	30,0	50	55,0	73	79,7	96	104,2
28	31,1	51	56,1	74	80,8	97	105,3
29	32,2	52	57,1	75	81,8	98	106,3
30	33,3	53	58,2	76	82,9	99	107,4
31	34,4	54	59,3	77	84,0	100	108,4
32	35,5	55	60,3	78	85,1		

В коническую колбу емкостью 150 мл наливают 20 мл раствора глюкозы, содержащего не более 100 мг сахаристого вещества (в противном случае исходный раствор сахара должен быть соответственно разбавлен) и добавляют смесь из 20 мл раствора I и 20 мл раствора II. Нагревают до кипения и кипятят ровно три минуты. Жидкость после этого должна быть окрашена в синий цвет, т. е. должен еще быть избыток соли окиси меди. Дают осесть образовавшемуся красному осадку закиси меди и затем осторожно, путем декантации, стараясь по возможности не взмучивать осадка, фильтруют жидкость через стеклянный пористый фильтр и промывают осадок в колбе и на фильтре горячей водой до исчезновения щелочной реакции. При этом следят за тем, чтобы осадок все время был покрыт водой (во избежание окисления закиси меди). После этого осадок на фильтре растворяют в возможно малом объеме раствора III и количественно переносят полученный раствор в коническую колбу с главным осадком. Туда добавляют еще раствор III (всего около 20 мл) и легким встряхиванием добиваются полного растворения осадка закиси меди. Если этого не произошло, добавляют

еще небольшое количество раствора III. Полученный раствор титруют 0,1 н. или 0,2 н. раствором перманганата до перехода зеленого окрашивания в розовое.

Результат определения выражают в мг%. Если, например, при определении глюкозы в 20 мл раствора на титрование пошло 15 мл 0,1 н. раствора перманганата, то количество определенной титрованием меди $6{,}36 \times 15 = 95{,}4$ мг. По таблице это количество меди соответствует 50 мг глюкозы и, следовательно, содержание глюкозы в исследуемом растворе 250 мг%.

В случае определения не глюкозы, а другого сахара, необходимо пользоваться специальной таблицей. Например, для определения мальтозы берут 10 или 20 мл раствора с содержанием 10—100 мг мальтозы. Определение ведут так же, как это описано для случая глюкозы. Количество миллиграммов определенной титрованием меди переводят по таблице 9 для мальтозы в миллиграммы мальтозы и результат определения выражают в мг%.

Работа 50. **Определение глюкозы с гипоиодитом**

Альдозы окисляются гипоиодитом в альдоновые кислоты; в частности, глюкоза окисляется с образованием глюконовой кислоты по суммарному уравнению:

$$CH_2OH(CHOH)_4 \cdot \underset{H}{\overset{O}{C}} + J_2 + 3NaOH =$$
$$= CH_2OH(CHOH)_4 \cdot COONa + 2NaJ + 2H_2O$$

которое слагается из двух реакций:

$$2NaOH + J_2 = NaOJ + NaJ + H_2O$$
$$R \cdot \underset{H}{\overset{O}{C}} + NaOJ + NaOH = R \cdot COONa + NaJ + H_2O$$

Параллельно основной реакции окисления протекает реакция

$$3NaOJ = NaJO_3 + 2NaJ$$

скорость которой, однако, при достаточной щелочности раствора очень мала, по сравнению со скоростью восстановления гипоиодита. Поэтому определение альдоз должно вестись в достаточно щелочном растворе. С другой стороны, при избытке щелочи реакция окисления не останавливается на образовании альдоновой кислоты, которая окисляется дальше и при значительной концентрации щелочи нельзя точно установить время конца реакции. Таким образом, результаты определения зависят от концентрации и ко-

личества взятой щелочи, которой, во всяком случае, должно быть достаточно для нейтрализации образующейся глюконовой кислоты.

Окисление альдоз гипоиодитом интересно не только тем, что протекает по стехиометрическому уравнению, но также и тем, что при соблюдении определенных условий кетозы не окисляются гипоиодитом. Это делает метод применимым для определения альдоз в присутствии кетоз, например, глюкозы в присутствии фруктозы. Однако, при применении метода к биохимическим объектам, следует иметь в виду, что кроме альдоз некоторые другие вещества могут также окисляться в указанных условиях.

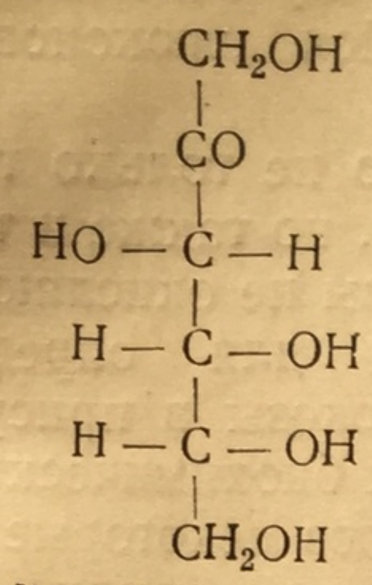
К 20 мл 0,5%-ного раствора глюкозы приливают из бюретки точно отмеренный объем 0,1 н. раствора иода. Количество иода берут в 1,5—2 раза больше требующегося по уравнению. Затем при обычной температуре и энергичном взбалтывании прибавляют по каплям 0,1 н. раствор едкого натра в полуторакратном избытке по сравнению с теоретическим количеством (при расчете на иод). Смесь оставляют стоять 10—20 минут. Осторожно подкисляют 25%-ной серной кислотой до едва заметной реакции на конго и титруют выделившийся иод 0,1 н. раствором тиосульфата, вначале до слабожелтой окраски, а затем, после прибавления нескольких капель раствора крахмала, до исчезновения синей окраски.

Одновременно ставят контрольный опыт, где вместо раствора глюкозы берут 20 мл воды. Из объема раствора тиосульфата, пошедшего в контрольном опыте, вычитают объем, пошедший на основное титрование. Разность, выраженную в миллилитрах 0,1 н. раствора иода, пересчитывают в миллиграммы сахара, имея в виду, что по вышеприведенному уравнению 1 мл 0,1 н. раствора иода соответствует 9,005 мг глюкозы, или 17,11 мг мальтозы. Результат определения выражают в мг %.

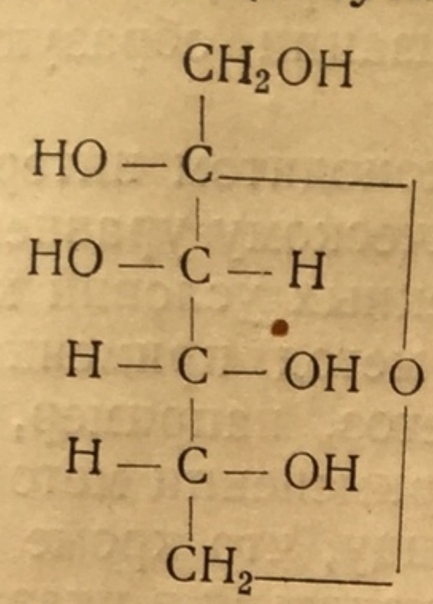
Ошибка определения не превышает 0,5%. При концентрации глюкозы 0,1% и общем количестве титруемой глюкозы в 10 мг ошибка не больше 1—1,5%.

Определение глюкозы с гипоиодитом может быть проведено и в следующей модификации метода. Берут 25 мл раствора с содержанием не более 100 мг глюкозы, добавляют 0,1 н. раствора иода в иодистом калии в 1,5—2 раза более теоретического и затем прибавляют 100 мл смеси равных частей 0,2 молярных растворов Na_2CO_3 и $NaHCO_3$ и оставляют на 1,5 часа в темном месте. После этого осторожно подкисляют 25%-ной серной кислотой и титруют избыток иода 0,1 н. раствором тиосульфата в присутствии крахмала. Параллельно ставят контрольный опыт, в котором берут те же компоненты, но вместо раствора глюкозы добавляют 100 мл воды. Из расхода тиосульфата в контрольном опыте вычитают объем тиосульфата, пошедший на основной опыт. По разности вычисляют количество глюкозы.

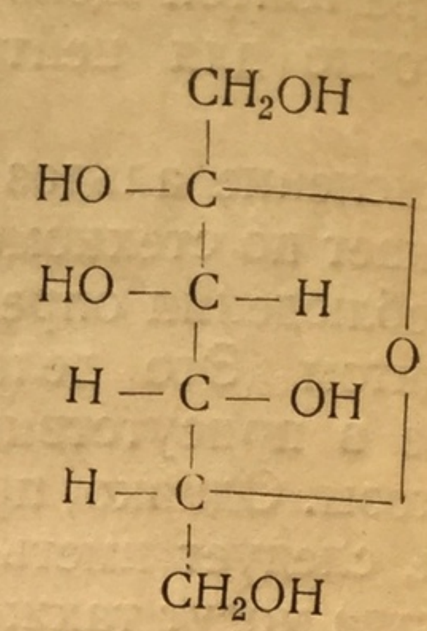
Работа 51. *d*-(—)-Фруктоза (левулоза)



Кето-*d*-фруктоза



d-фруктопираноза



d-фруктофураноза
(*am*- или *h*-*d*-фруктоза)

Фруктоза особенно широко распространена в составе растительных организмов. Является структурным элементом при построении различных олигосахаридов и некоторых полисахаридов (инулин). Редуцирующий сахар; в растворах обнаруживает явление мутаротации. Конечное $[\alpha]_D^{20°} = -92°$. С фенилгидразином дает фенилозазон, идентичный с озазонами *d*-глюкозы и *d*-маннозы. Отличается от этих сахаров тем, что легко образует метилфенилозазон с температурой плавления 158—160° при действии метилфенилгидразина. Дрожжами сбраживается также легко, как и *d*-глюкоза.

1. Определение удельного вращения. Водный раствор *d*-фруктозы, содержащий 2 г вещества в 100 мл, исследуют в поляриметре, определяют α и находят $[\alpha]_D$.

2. Получение озазона. Озазон образуется из *d*-фруктозы еще легче, чем из *d*-глюкозы. Для получения озазона поступают аналогично описанному получению *d*-глюкозазона (работа 44). Полученный озазон перекристаллизовывают из водного алкоголя, определяют температуру плавления (204—205°) и температуру плавления смеси с *d*-глюкозазоном. Убеждаются в идентичности полученного озазона с *d*-глюкозазоном.

3. Цветные реакции и реакции восстановления. С 1%-ным раствором фруктозы делают пробы Добедова-Молиша, Фелинга, Барфёда и пробу с аммиачным раствором серебра. Все эти пробы положительны.

Работа 52. Реакция Селиванова

Реакция Селиванова дает возможность отличить фруктозу от глюкозы и вообще кетозы от альдоз. Основана она также, как и реакция Молиша, на образовании, при действии соляной кислоты на фруктозу, ω-оксиметилфурфурола, дающего с резорцином окрашенный продукт конденсации. Эту реакцию, вообще говоря, дают и альдозы, но при более длительном воздействии соляной кислоты.

5 мл 2—3%-ного раствора фруктозы смешивают с 5 мл 25—30%-ной соляной кислоты и несколькими кристаллами резорцина.

При коротком нагревании появляется интенсивное красное окрашивание. Параллельно ставят ту же пробу с 1—2%-ным раствором глюкозы.

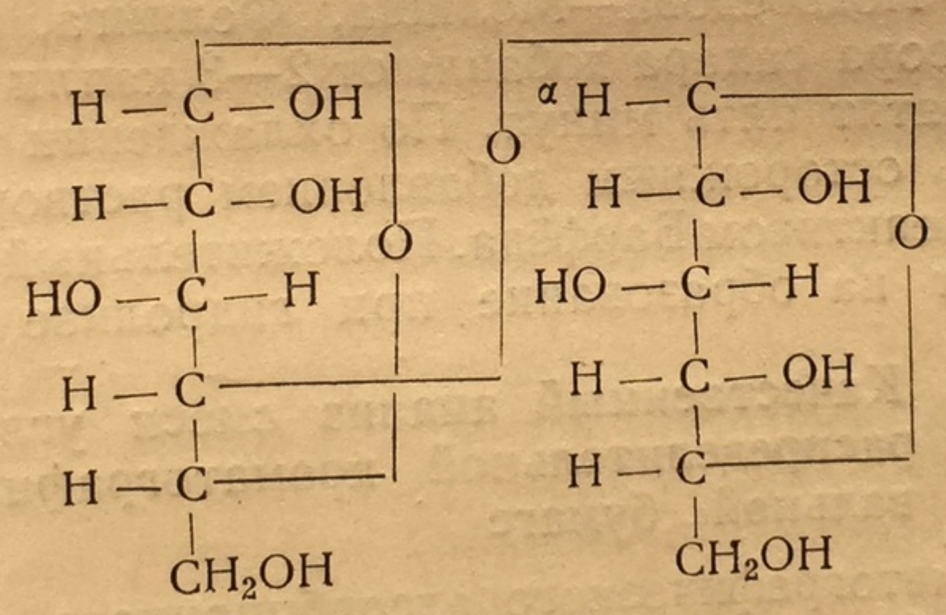
Работа 53. **Цветная реакция с ванилином**

Эта реакция основана на конденсации продуктов расщепления фруктозы с ванилином (4-окси-3-метоксибензальдегидом), причем, в зависимости от концентрации сахара, получается слаборозовое или красное окрашивание. Реакция отрицательна с глюкозой, галактозой, аскорбиновой кислотой, диоксиацетоном, но положительна с олигосахаридами и полисахаридами, в состав которых входит фруктоза, например, с сахарозой, инулином.

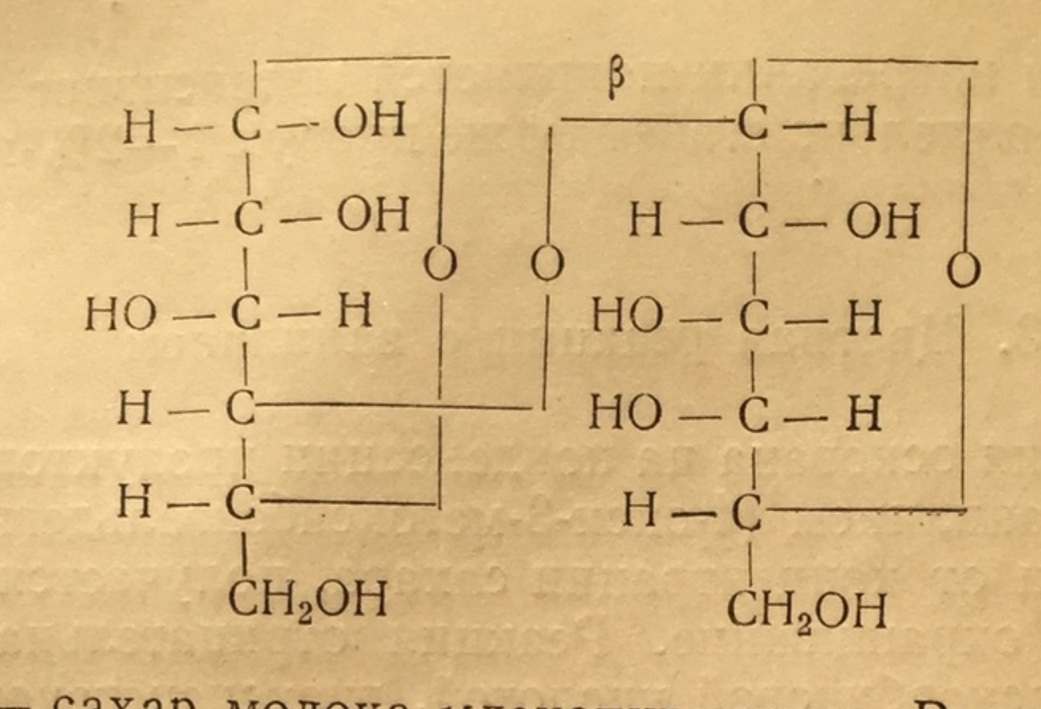
Ванилиновый реагент готовят, растворяя 0,2 г ванилина в смеси 25 мл концентрированной соляной кислоты и 75 мл 85%-ной фосфорной кислоты. Такой раствор хранят в хорошо закрытой темной склянке.

1 мл исследуемого раствора (менее 1% фруктозы) смешивают с 5 мл ванилинового реагента и нагревают две минуты на водяной бане, после чего быстро охлаждают в ледяной воде. Окраска затем устойчива и пригодна для количественных колориметрических определений.

Работа 54. **Мальтоза (4-[α-*d*-глюкозидо-(1,5)]-*d*-глюкоза (1,5) и лактоза (4-[β-*d*-галактозидо-(1,5)]-*d*- глюкоза (1,5)**



Мальтоза (солодовый сахар) образуется при диастатическом гидролизе крахмала. Редуцирующий сахар; дает реакцию восстановления с реактивом Фелинга, но не восстанавливает реактив Барфёда. В растворах обнаруживает явление мутаротации. Конечное $[\alpha]_D^{20°} = +136°$; α-мальтоза — $[\alpha]_D^{20°} = +160°$; β-мальтоза — $[\alpha]_D^{20°} = +118°$. Образует озазон. Расщепляется дрожжами (α-глюкозидаза) на две молекулы *d*-глюкозы. Не изменяется под действием эмульсина (β-глюкозидазы).



Лактоза — сахар молока млекопитающих. Редуцирующий сахар. Восстанавливает жидкость Фелинга, но не выделяет закиси меди при нагревании с реактивом Барфёда. В растворах обнаруживает мутаротацию. Конечное $[\alpha]_D^{20°} = +55{,}2°$. Дает озазон. При действии лактазы молочнокислых дрожжей (β-галактозидаза) и эмульсина (β-глюкозидазы), а также кишечным соком животных расщепляется на *d*-глюкозу и *d*-галактозу. Не расщепляется α-глюкозидазами.

1. Получение фенилмальтозазона и фениллактозазона. Озазоны получают в условиях, аналогичных описанным при получении *d*-глюкозазона. Здесь озазоны, легче растворимые в воде, выпадают лишь по охлаждении жидкости. Фенилмальтозазон имеет температуру плавления 206°, фениллактозазон — температуру плавления 210—212°.

2. Цветные реакции и реакции восстановления. С 1—2%-ными растворами мальтозы и лактозы делают пробы Подобедова—Молиша, Фелинга, Барфёда. Затем к 2—3 мл раствора сахара добавляют 2—3 капли 25%-ной серной кислоты и кипятят пять минут. По охлаждении точно нейтрализуют жидкость осторожным добавлением раствора едкого натра и нагревают с реактивом Барфёда. Положительный результат реакции указывает на образование при гидролизе моносахаридов.

Работа 55. **Качественный анализ смеси углеводов методом распределительной хроматографии на фильтровальной бумаге**

Метод хроматографического адсорбционного анализа оыл открыт и разработан в 1903—1906 гг. русским исследователем М. С. Цветом. В настоящее время этот метод нашел себе широчайшее применение при разделении сложнейших смесей биологических соединений: пигментов, аминокислот, антибиотиков, витаминов, энзимов, гормонов. Одним из вариантов метода М. С. Цвета является нижеследующий способ распределительной хроматографии на фильтровальной бумаге.

При движении какого-либо несмешивающегося с водой растворителя по целлюлозной бумаге происходит распределение растворенного вещества между двигающимся по поверхности целлюлоз-

ного волокна растворителем и связанной этим волокном водой. Относительное расстояние, на которое передвигается растворенное вещество, в направлении движения растворителя, зависит, при определенных избранных условиях опыта, только от коэфициента распределения данного вещества между водой и растворителем. Таким образом, после достаточно продолжительного размывания растворителем нанесенной на бумагу смеси сахаров, характеризующихся различными коэфициентами распределения, компоненты смеси оказываются локализированными на различных расстояниях по направлению движения растворителя. После удаления растворителя путем высушивания при 100—105°, хроматограмма проявляется, для чего служит смесь равных объемов 0,1 н. раствора азотнокислого серебра и 5 н. раствора аммиака, которой смачивается бумага. При высушивании на бумаге образуются темнокоричневые пятна на местах локализации отдельных редуцирующих сахаров.

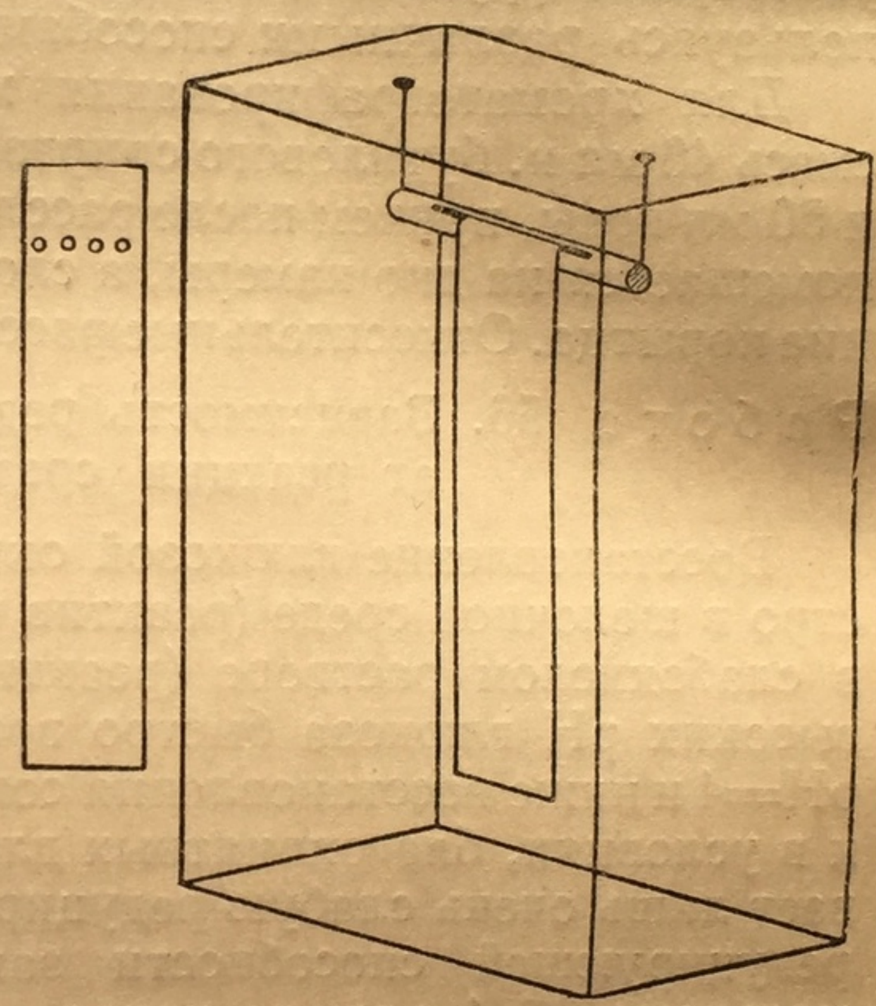


Рис. 9. Камера для хроматографирования.

В случае фруктозы и, особенно, нередуцирующих олигосахаридов, содержащих фруктозу, для проявления хроматограммы пользуются смесью равных объемов 0,2%-ного алкогольного раствора нафторезорцина и 2,0%-ного водного раствора трихлоруксусной кислоты (приготовляемой непосредственно перед употреблением). При этом после высушивания получаются яркокрасные пятна.

Метод позволяет определить качественный состав смеси углеводов в том или ином биологическом объекте. Определению может мешать присутствие некоторых органических оснований и солей (NaCl и KCl), дающих при проявлении хроматограммы аммиачным раствором серебра коричневые пятна.

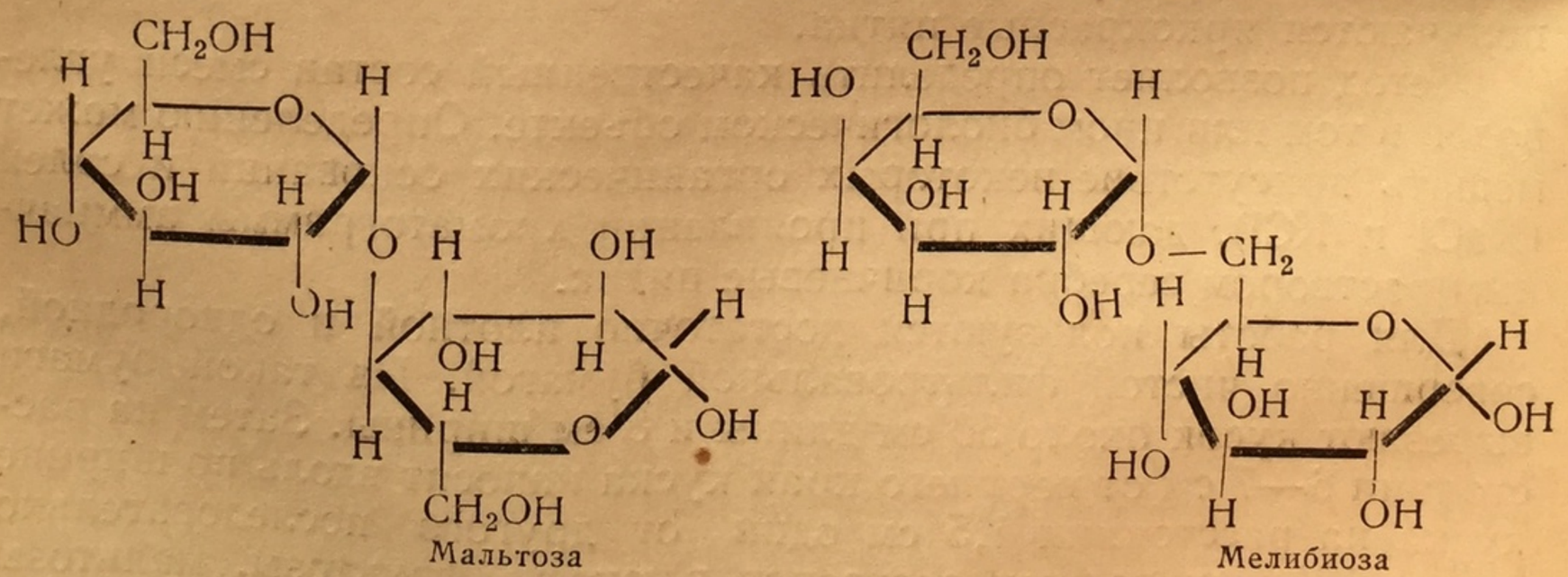
Для работы пользуются достаточно плотной и однородной, совершенно чистой фильтровальной бумагой. Из такой бумаги вырезают кусок около 50 см длины и 8 см ширины. Затем на расстоянии 6—7 см от верхнего края куска наносят вдоль по ширине куска на расстоянии 1,5 см один от другого последовательно капли 1%-ных водных растворов глюкозы, фруктозы, мальтозы и затем каплю смеси всех трех растворов. Верхний край куска бумаги опускают затем в корытце (из стекла или нержавеющей стали), наполненное фенолом, насыщенным водой, и укрепленное в стеклянной или металлической камере (рис. 9), герметически

закрывающейся. На дно камеры помещают насыщенную фенолом воду (для насыщения воздуха камеры). Хроматографирование продолжают около 20 часов, после чего бумагу вынимают из камеры, отмечают фронт распространения растворителя и высушивают бумагу при 100—105°. Затем бумагу смачивают аммиачным раствором азотнокислого серебра и быстро (5—10 минут) высушивают в шкафу при 105°. Определяют относительное расстояние для каждого отдельного сахара как отношение расстояния до соответствующего пятна к расстоянию до фронта распространения растворителя. Повторяют опыт хроматографирования с 1%-ными растворами фруктозы, сахарозы, мальтозы и смесью этих сахаров, пользуясь различными способами проявления.

Для хроматографирования может быть использована также смесь 40 мл н. бутилового спирта, 10 мл ледяной уксусной кислоты и 50 мл воды, причем после расслаивания такой смеси водный слой помещается на дно камеры, а слой растворителей идет на заполнение корытца. Относительные расстояния здесь иные, чем с фенолом.

Работа 56. **Зависимость редуцирующей способности сахаров от реакции среды и строения молекулы сахара**

Восстановление глюкозой окиси меди в закись протекает быстро в щелочной среде (реактив Фелинга) и значительно медленнее в слабокислом растворе (реактив Барфёда). При pH=5 и более высоких pH глюкоза быстро восстанавливает окись меди, а при pH=4 и ниже восстановления совсем не наблюдается. Мальтоза же и в условиях, благоприятных для окисления глюкозы, обнаруживает лишь очень слабую редуцирующую способность. Это падение редуцирующей способности зависит от особенности строения мальтозы (1,4-α-глюкозидная связь). Дисахариды, молекула которых содержит 1,6-α-глюкозидную связь, например, мелибиоза (6-[α-*d*-галактозидо]-*d*-глюкоза), восстанавливают окись меди почти также энергично, как и моносахарид глюкоза:

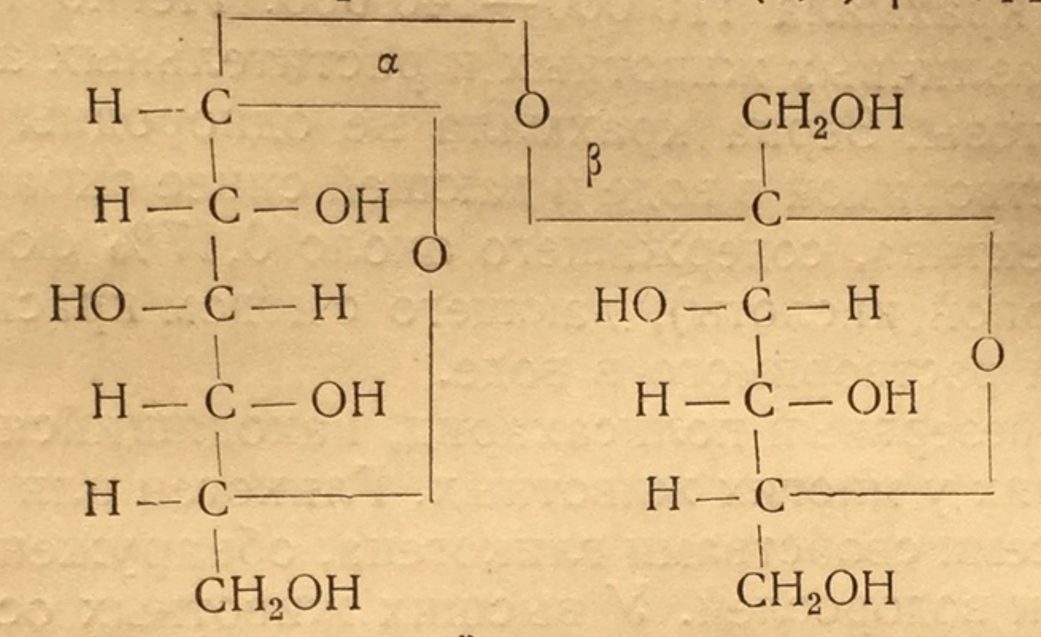


Таким образом, по энергии восстановления сахаром окиси меди при pH=5—6 можно судить о строении сахара (отличие моносахаридов от дисахаридов типа мальтозы и этих последних от дисахаридов с 1,6-α-глюкозидной связью).

Смешивают 10 мл раствора исследуемого сахара, содержащего от 10 до 100 мг глюкозы или мальтозы, с 20 мл раствора ацетата меди (66,5 г кристаллической соли на 1 000 мл) и 20 мл 2 н. ацетатного буфера (Na-ацетат+уксусная кислота) с pH=5,7 и кипятят смесь 5 минут. Выделившуюся закись меди отфильтровывают и определяют по методу Бертрана.

Сравнивают редуцирующую способность различных сахаров. При пересчете найденного количества меди в сахар для каждого отдельного сахара необходимо пользоваться специальной таблицей.

Работа 57. **Сахароза [*α*-*d*-глюкозидо (1,5)-β-*d*-фруктозид (2,5)]**



Сахароза, или тростниковый сахар, один из распространеннейших растительных дисахаридов. Не обладает редуцирующей способностью, не обнаруживает в растворах мутаротации и не образует озазона. $[\alpha]_D^{20°}=+66,5°$.

Так как специфичность олигосахараз (глюкозидаз) относится к глюкозидно связанному остатку монозы, то сахароза, в которой обе монозы соединены за счет своих глюкозидных групп, расщепляется двумя энзимами: α-глюкозидазой и β-h-фруктозидазой. Оба фермента находятся в дрожжах и отличаются оптимумом pH: оптимум активности α-глюкозидазы—pH=6,5—7,0, а β-h-фруктозидазы — pH=4,7. При гидролитическом расщеплении сахарозы образуются эквимолекулярные количества *d*-глюкозы и *d*-фруктозы. Сам процесс носит название инверсии, так как в результате расщепления направление вращения изменяется: $[\alpha]_D^{20°}=+66,5°$ переходит в $[\alpha]_D^{20°}=-20°$.

С 5—10%-ным раствором сахарозы делают пробы Подобедова-Молиша и Селиванова. Затем раствор сахарозы нагревают с реактивом Фелинга. Восстановления при этом не наблюдается. 5—10 мл раствора сахарозы нагревают с несколькими каплями 10%-ной серной кислоты. По охлаждении жидкость осторожно нейтрализуют, делят на две части и с полученным гидролизатом делают пробы Фелинга и Барфёда. Результат проб положительный, что указывает на образование в результате гидролиза моносахаридов.

ПОЛИСАХАРИДЫ

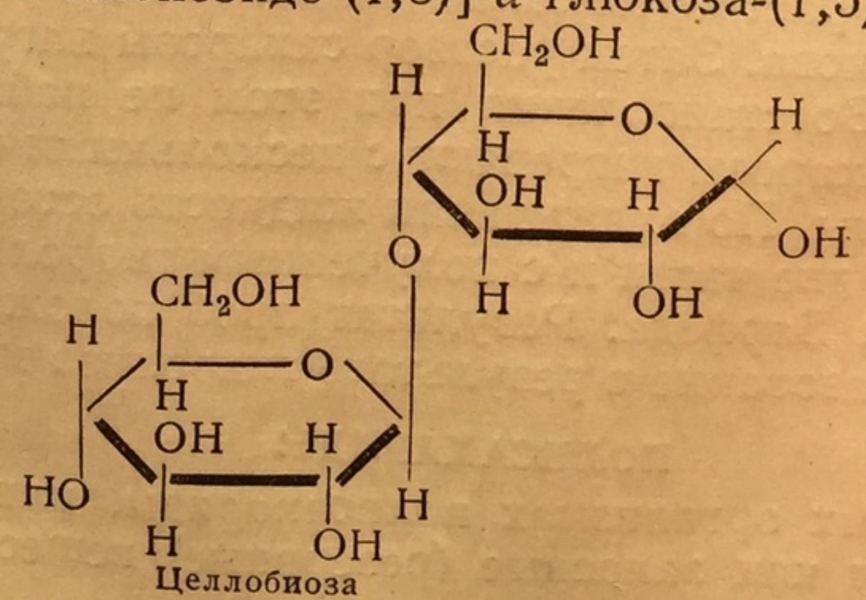
В растительных организмах полисахариды, или полиозы, откладываются или как запасные (резервные) вещества (крахмал,

инулин), или же входят в состав стенки растительной клетки (целлюлозы), и в таком случае играют существенную роль в построении твердого остова растений. В организме животных встречаются как полиозы, являющиеся резервными углеводами (гликоген), так и, в отдельных случаях, полиозы, имеющие значение структурных веществ (туницин оболочников и моллюсков, хитин насекомых и ракообразных).

Крахмал — растительный резервный полисахарид, молекула которого построена из глюкозидносвязанных остатков *d*-глюкозы, нерастворимый в воде, дающий синее окрашивание с иодом. Молекулярный вес крахмала 110 000—140 000. Легко гидролизуется при действии различных животных и растительных амилаз с образованием мальтозы. Зерна крахмала не однородны и состоят из амилозы, нерастворимой в воде и дающей синее окрашивание с иодом, и амилопектина, содержащего около 0,17% фосфора (в виде остатка фосфорной кислоты), дающего с иодом красно-фиолетовое окрашивание и растворимого в воде.

Гликоген—резервный полисахарид, находящийся в различных органах и тканях у многих животных. Гликоген или полисахарид, обладающий всеми свойствами гликогена, обнаружен также у грибов, дрожжей и водорослей. У высших животных особенно много гликогена в печени. Гликоген по многим свойствам напоминает крахмал, но отличается от него своей растворимостью в воде и тем, что с иодом дает красновато-бурую окраску. По характеру этой окраски и по содержанию остатка фосфорной кислоты сходен с амилопектином. Молекулярный вес 110 000—140 000. $[\alpha]_D^{20^\circ} = +196^\circ$. Гликоген очень устойчив к действию даже концентрированных растворов едких щелочей. При кислотном гидролизе дает также, как и крахмал, *d*-глюкозу, а при энзиматическом гидролизе (при действии амилаз) образуется мальтоза.

Целлюлоза—нерастворимый в воде полисахарид, молекула которого построена из 200—2 000 остатков *d*-глюкозы. Отличается от крахмала и гликогена тем, что не дает окрашивания с иодом, значительно труднее гидролизуется в кислых растворах и не гидролизуется при действии амилаз. При полном гидролизе образуется *d*-глюкоза, при осторожном гидролизе получается целлобиоза или 4-[β-*d*-глюкозидо-(1,5)]-*d*-глюкоза-(1,5)



Целлобиоза

что говорит о наличии β-глюкозидных связей в молекуле целлюлозы.

Работа 58. **Получение крахмала и растворимый крахмал**

1. Получение крахмала. Картофель освобождают от кожицы, измельчают на терке и отделяют крахмал отмучиванием. Отмученный крахмал отфильтровывают и высушивают. Рассматривают под микроскопом форму зерен и сравнивают с формой зерен пшеничного крахмала. Окрашивают зерна крахмала под микроскопом, добавляя каплю раствора J в KJ. Исследуют растворимость полученного крахмала в холодной и горячей воде и спирте. В холодной воде крахмал не растворяется, а в горячей — набухает.

2. Растворимый крахмал (амидулин). Растворимый крахмал является первой ступенью деструкции крахмала с меньшей степенью ассоциации или полимеризации, чем исходный крахмал. Обыкновенный крахмал может быть превращен в растворимый крахмал (амидулин) или при длительном действии разбавленных кислот на холоду, или при длительном нагревании предварительно в течение короткого времени обработанного кислотами крахмала, или же при нагревании крахмала с глицерином при 190°.

0,5 г растворимого крахмала смешивают в равномерную кашицу с небольшим количеством воды, добавляют при перемешивании до 100 мл горячей воды и некоторое время нагревают до полного растворения.

Для исследования свойств полученного раствора к нему по охлаждении добавляют спирт и, в другой пробе, твердый сернокислый аммоний до полного насыщения. Выпавший в обоих случаях крахмал отделяют и снова растворяют в воде.

Полученный раствор крахмала нагревают с реактивом Фелинга. Эта проба дает отрицательный результат, так как крахмал не обладает редуцирующим действием. Затем к 10 мл раствора крахмала добавляют несколько капель 25%-ной серной кислоты и кипятят 10 минут. Полученную после гидролиза жидкость делят на две части. Половину нейтрализуют и нагревают с реактивом Фелинга, а половину точно нейтрализуют осторожным добавлением щелочи и нагревают с реактивом Барфёда. Положительный результат и той и другой пробы указывает на то, что в результате гидролиза крахмала образуется моносахарид *d*-глюкоза.

Работа 59. **Реакция крахмала с иодом**

Для крахмала, гликогена и близких к ним декстринов является характерным синее, красновато-фиолетовое или буроватое окрашивание при добавлении к их растворам раствора иода в растворе иодистого калия. Многие другие полисахариды как цел-

люлоза, инулин, лихенин, не дают окрашивания с иодом. Реакция эта основана на образовании нестойкого адсорбционного соединения с иодом. При этом синее окрашивание, которое характерно для крахмала и близких к нему амилодекстринов, обусловлено образованием адсорбционного соединения иода с амилозой, состав которого колеблется от nJ_2+10n $(C_6H_{10}O_5)$ до nJ_2+20n $(C_6H_{10}O_5)$. Благодаря непрочности этого соединения и коллоидным свойствам раствора, реакция крахмала с иодом чувствительна к присутствию спирта, к нагреванию и действию едких щелочей, с которыми иод образует гипоиодиты.

К раствору крахмала добавляют 2—3 капли раствора J в KJ. Окрашенный в синий цвет раствор делят на три части. К первой добавляют 10%-ный раствор едкого натра, ко второй — алкоголь и третью нагревают до кипения. Во всех случаях окраска исчезает, причем в третьей пробе окраска вновь появляется при охлаждении.

Работа 60. **Промежуточные ступени гидролиза крахмала**

Следующими за растворимым крахмалом (амидулином) ступенями деструкции крахмала являются декстрины, причем они образуются в качестве промежуточных продуктов как кислотного, так и диастатического гидролиза крахмала. Обычно различают четыре группы декстринов.

Амилодекстрины. Дают синее окрашивание с раствором J в KJ. Осаждаются спиртом. $[\alpha]_D \cong +196°$. По строению они ближе к крахмалу, чем другие декстрины. Восстановительная способность (с реактивом Фелинга)—1% восстановительной способности мальтозы.

Эритродекстрины. Дают с раствором J в KJ красное окрашивание. Осаждаются спиртом. $[\alpha]_D \cong +194°$. Восстановительная способность — 2—3% восстановительной способности мальтозы.

Ахродекстрины. С раствором J в KJ не дают окраски. Растворяются в 70% спирте. $[\alpha]_D \cong +192°$. Восстановительная способность —10% восстановительной способности мальтозы.

Мальтодекстрины. С раствором JвKJ не дают окраски. Не осаждаются спиртом. $[\alpha]_D \cong +183°$. Восстановительная способность —30—40% восстановительной способности мальтозы.

Дальнейшими продуктами гидролиза крахмала являются мальтоза и *d*-глюкоза, причем энзиматический гидролиз, при действии амилаз, протекает только до образования мальтозы.

Берут 10—20 пробирок, наполняют их до половины холодной водой и в каждую прибавляют 1—2 капли раствора J в KJ. Затем к 20 мл раствора крахмала прибавляют 0,5 мл 20%-ной серной кислоты и нагревают при кипении. В начале опыта, а затем через каждые две-три минуты отбирают 0,5 мл жидкости и переносят в приготовленные пробирки с водой. Получается постепенное изменение цвета от синего к красному, а затем окрашивания не получается вообще. Жидкость кипятят еще некоторое время и по охлаж-

дении и нейтрализации убеждаются в наличии в ней редуцирующего сахара (проба Фелинга).

Такой же точно опыт ставят, заменяя для гидролиза серную кислоту 1 мл профильтрованной и разведенной слюны. Смесь ставят в термостат при 34—40° и время от времени отбирают пробы жидкости. Получают, как и в предыдущем опыте, различные окраски с иодом. Исследуют жидкость в конце гидролиза на присутствие редуцирующего сахара (пробы Фелинга и Барфёда).

Работа 61. **Гидролиз целлюлозы (клетчатки)**

Кислотный гидролиз целлюлозы идет значительно труднее, чем гидролиз крахмала и гликогена. В присутствии разбавленных кислот такой гидролиз достаточно полно протекает только после длительного нагревания. Значительно легче гидролиз идет, если целлюлозу обработать предварительно 70—80%-ной серной кислотой, а уже затем закончить гидролиз нагреванием с разбавленной кислотой.

Небольшой кусочек ваты (клетчатка) нагревают при кипении с 2—3%-ной серной кислотой 10 минут, нейтрализуют и нагревают с реактивом Фелинга. Проба дает отрицательный результат. Небольшой кусочек ваты вновь растворяют, но уже в 80%-ной серной кислоте, разбавляют водой и кипятят 5 минут. Нейтрализуют жидкость и нагревают с реактивами Фелинга и Барфёда. В обоих случаях проба теперь положительна, что говорит об образовании при гидролизе моносахарида (*d*-глюкоза).

Работа 62. **Получение гликогена**

Для получения гликогена из печени животного необходимо по возможности, быстрое извлечение его из ткани, так как гликоген исчезает благодаря ферментативному расщеплению. Одним из наиболее простых способов получения из печени экстракта, содержащего гликоген, является извлечение раствором трихлоруксусной кислоты, причем получающийся экстракт одновременно освобождается от растворимых белков.

Взвешенную печень только что убитого кролика растирают с равным объемом 10%-ной трихлоруксусной кислоты и чистым кварцевым песком. Затем добавляют двойной объем 5%-ной трихлоруксусной кислоты, перемешивают и отсасывают жидкость. Остаток повторно растирают с равным объемом 5%-ной трихлоруксусной кислоты и отсасывают жидкость. Полученные экстракты соединяют и добавляют алкоголь до концентрации 50%. Выпавший осадок отделяют центрифугированием, два раза промывают 50-%ным алкоголем. Полученный таким путем чистый гликоген высушивают и взвешивают. Так как при этом способе почти нет потерь гликогена, то полученный вес относят к весу взятой печени и находят приблизительное содержание гликогена в процентах.

Часть полученного гликогена растворяют в воде. С этим раствором делают реакцию с иодом и пробы на редуцирующую способ-

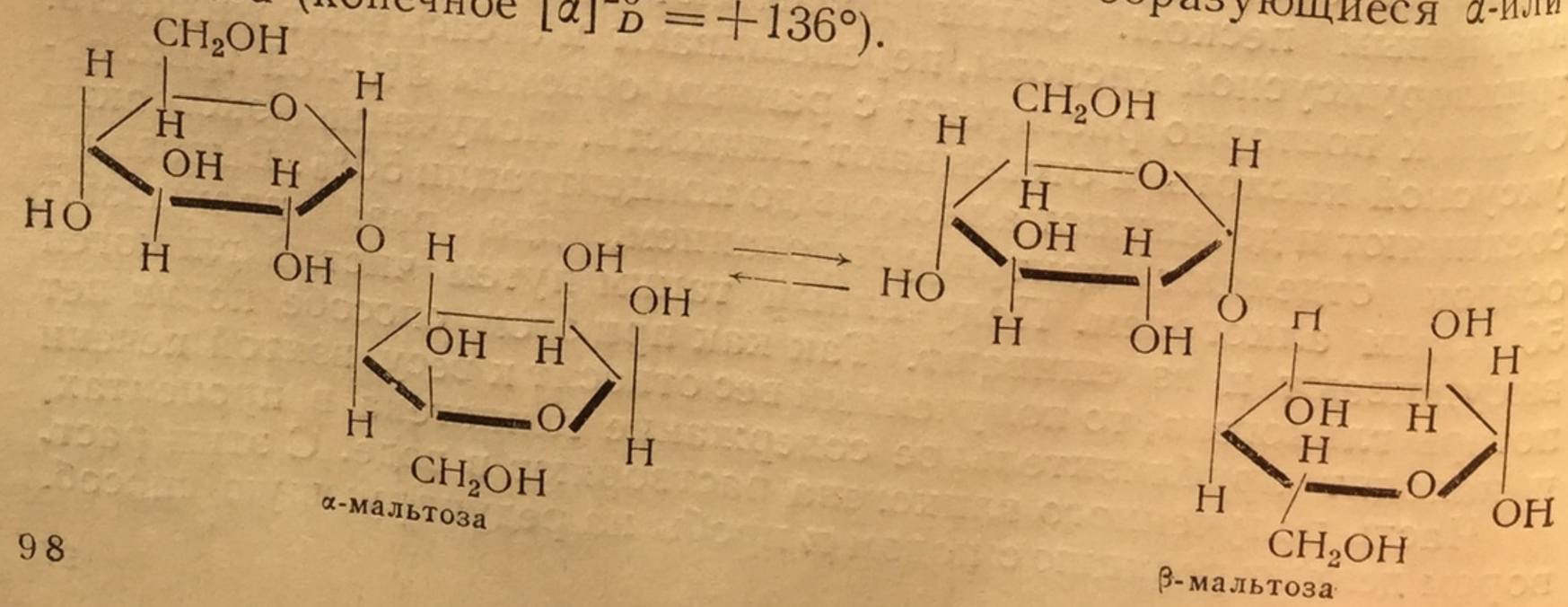
ность (пробы Барфёда и Фелинга). Затем нагревают раствор с очень разбавленной серной кислотой и после охлаждения и нейтрализации делают те же пробы на присутствие редуцирующего сахара.

ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ ГИДРОЛИЗ УГЛЕВОДОВ

В желудочно-кишечном тракте животных такие полисахариды, как крахмал, гликоген и различные олигосахариды, подвергаются энзиматическому гидролизу. Крахмал и гликоген гидролитически расщепляются при участии амилазы слюны и панкреатической амилазы. Дисахариды гидролизуются при действии глюкозидаз: мальтазы слюны и мальтазы, сахаразы и лактазы панкреатического и кишечного сока. Таким образом, все эти углеводы испытывают полный энзиматический гидролиз до моносахаридов (*d*-глюкозы, *d*-фруктозы, *d*-галактозы), которые через стенку кишечника поступают в кровь воротной вены.

В желудочно-кишечном тракте высших животных нет ферментов, катализирующих гидролиз целлюлозы. Такие ферменты (целлюлазы) обнаружены только у некоторых моллюсков, насекомых и ракообразных. Однако, целлюлоза энергично расщепляется ферментами грибов и бактерий. За счет ферментов кишечной флоры животных целлюлоза разлагается до водорода, углекислоты или метана и жирных кислот (уксусной, масляной и др.). Поэтому симбиоз высших животных, особенно растительноядных, с флорой их желудочно-кишечного тракта имеет исключительное значение для усвоения ими клетчатки.

При расщеплении крахмала и гликогена под действием амилаз в обычных условиях, конечным продуктом распада всегда является равновесная смесь α-и β-мальтозы. В действительности же амилазы различного происхождения отличаются по своему действию на крахмал. Распад крахмала при действии солодовой амилазы (преимущественно β-амилазы) приводит к образованию β-мальтозы — $[\alpha]_D^{20°} = +118°$, а при расщеплении такадиастазом (Aspergillus oryzae) и панкреатической амилазой (преимущественно α-амилазы) образуется α-мальтоза — $[\alpha]_D^{20°} = +160°$. Образование обычной равновесной мальтозы является результатом мутаротации, которую в дальнейшем испытывают первоначально образующиеся α-или β-мальтоза (конечное $[\alpha]_D^{20°} = +136°$).



α-и β-амилазы отличаются по своей устойчивости к нагреванию, различно относятся к активированию хлористым натрием и угнетению α-и β-мальтозой и аскорбиновой кислотой. Они отличаются и по характеру ускоряемого ими гидролиза; при действии α-амилазы происходит быстрое образование декстринов при сравнительно медленном накоплении мальтозы, а при действии β-амилазы происходит быстрое накопление мальтозы при сравнительно медленном исчезновении декстринов. Таким образом, α-амилаза соответствует декстриногенамилазе, действие которой связано преимущественно с образованием декстринов, а β-амилаза быстрее приводит к осахариванию (сахарогенамилаза). В соответствии с этими двумя сторонами диастатического гидролиза может быть определена активность амилокластического (декстринирующего) или осахаривающего действия амилаз.

Работа 63. **Определение амилокластической активности (декстринирующего действия) панкреатической амилазы**

Метод определения амилокластической активности (декстринирующего действия) амилаз изложен в работе 39, применительно к определению активности амилазы слюны. Пользуясь этим методом, определяют амилокластическую активность водного или водно-глицеринового экстрактов, содержащих панкреатическую амилазу (см. работу 25). Панкреатическая амилаза, также как и амилаза слюны, активируется нейтральными солями и особенно хлоридами в противоположность растительным амилазам (β-амилазы), у которых такого активирования не наблюдается. Амилаза такадиастаза подобно животным амилазам активируется хлоридами.

Работа 64. **Определение осахаривающего действия панкреатической амилазы**

В колбу емкостью 50 мл наливают 25 мл 1%-ного раствора крахмала (0,25 г крахмала), 10 мл фосфатного буфера с pH=6,8 (5,1 мл 0,2 м. KH_2PO_4 и 4,9 мл 0,2 м. $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) и 1,0 мл 0,2 м. раствора хлористого натрия. Смесь помещают в термостат при 37° и приблизительно через пять минут прибавляют 1 мл экстракта, содержащего панкреатическую амилазу. Ровно через 10 минут после добавления фермента реакция прекращается добавлением 2 мл 1,0 н. серной кислоты. Смесь количественно переносят в коническую колбу и определяют образовавшуюся мальтозу с гипоиодитом (см. работу 50). Для этого добавляют 0,1 н. раствор иода, из расчета 0,6 мл раствора иода на каждый миллиграмм мальтозы и затем по каплям при хорошем взбалтывании приливают 0,1 н. раствор едкого натрия. Раствор щелочи берется в таком количестве, чтобы после нейтрализации прибавленной ранее кислоты и превращения однометалльного фосфата в двухметалльный (на что тре-

буется в общем около 30 мл 0,1 н. раствора едкого натра) щелочи было бы в 1,5 раза больше прибавленного раствора иода. После 10—20-минутного стояния смесь осторожно подкисляют 25%-ной серной кислотой до едва заметной реакции на конго и выделившийся иод оттитровывают 0,1 н. раствором тиосульфата.

Одновременно ставят контрольный опыт, причем смесь в термостат не помещается, но в дальнейшем опыт проводится совершенно аналогично описанному. Из объема раствора тиосульфата, пошедшего в контрольном опыте, вычитают объем, пошедший на основное титрование. Разность, выраженную в миллилитрах 0,1 н. раствора иода, пересчитывают в миллиграммы мальтозы, имея в виду, что 1 мл такого раствора отвечает 17,11 мг мальтозы. Если эта разность, например, составила 2 мл 0,1 н. раствора иода, то мальтозы образовалось в результате ферментативного гидролиза $17{,}11 \times 2 = 34{,}22$ мг или 0,0342 г. Отсюда вычисляют константу скорости мономолекулярной реакции, служащую мерой ферментативного действия, по формуле:

$$K = \frac{1}{t} \log_{10} \frac{a}{a - x},$$

где: t — время, x — количество образовавшейся мальтозы, a — начальная концентрация, равная действительному пределу осахаривания, или 75% исходной навески (0,25 г), т. е. 0,1875 г. Таким образом, для рассматриваемого случая:

$$K = \frac{1}{10} \log_{10} \frac{0{,}1875}{0{,}1875 - 0{,}0342} = 0{,}00874,$$

т. е. ферментативное действие равно 0,00874 „единицы амилазы".

Для данного метода следует брать такое количество фермента, чтобы константа реакции лежала в пределах 0,001—0,03; при этом за 10—30 минут расщепляется 10—30% крахмала.

ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

Глюкоза, приносимая кровью воротной вены в печень, превращается здесь в запасный углевод — гликоген, который и откладывается в клетках печени. В свою очередь, гликоген печени расщепляется до глюкозы, которая переходит в кровь сосудов большого круга кровообращения. Этой гликогенной функцией печени обеспечивается постоянное в норме содержание сахара в крови (60—90 мг % для крови и 70—110 мг % для плазмы) и лимфе.

Образование гликогена из глюкозы и обратное превращение гликогена в глюкозу происходит в результате ферментативных процессов фосфорилирования и дефосфорилирования. При синтезе гликогена глюкоза фосфорилируется в 6-фосфорный эфир глюкозы, последний затем изомеризуется в 1-фосфорный эфир

глюкозы, который далее, в реакции обратной фосфоролизу, превращается в гликоген. Те же реакции, протекающие в обратном направлении, ведут к образованию глюкозы из гликогена:

d-глюкоза
↓↑
d-глюкозо-6-фосфат
↓↑
d-глюкозо-1-фосфат
↓↑
гликоген

Содержание гликогена в печени не является постоянным и зависит прежде всего от состава пищи. В среднем содержание гликогена в печени человека около 6% от веса органа, а общее количество гликогена в печени в среднем 100—120 г. Так как ассимиляционная способность печени имеет известный предел, то при введении большого количества углеводов с пищей часть резорбированного сахара проникает через печень в кровь, вызывая тем самым пищевую (алиментарную) гипергликемию. Когда гипергликемия достигает 170 мг%, глюкоза появляется и в моче (глюкозурия). Подобные же явления наблюдаются (у человека) и при нарушении эндокринной функции панкреатической железы, причем в этом случае причиной гипергликемии является недостаточное образование и выделение в кровь гормона инсулина, стимулирующего окислительный распад углеводов в тканях и процесс гликогенообразования. Поэтому введение инсулина приводит к резкому снижению уровня сахара крови (гипогликемии) [1]. Гипергликемия (и связанная с нею глюкозурия) может быть вызвана также действием гормона надпочечников — адреналина, стимулирующего превращение гликогена в глюкозу.

Гликоген вторично отлагается во многих тканях, но в особенно заметных количествах происходит образование и отложение гликогена в мышцах, что стоит в связи с потреблением гликогена в процессе мышечной работы. Содержание гликогена в мышцах около 0,7%, а общее количество гликогена во всей массе мышц в среднем для человека около 250 г.

При мышечном сокращении наблюдается распад мышечного гликогена с образованием молочной кислоты. Превращение гликогена в молочную кислоту, или гликолиз, представляет собою анаэробный ферментативный процесс, состоящий из ряда отдельных

---

[1] Л. Соболевым в 1902 г. было впервые указано на возможность получения активных препаратов инсулина из поджелудочной железы и на значение применения этих препаратов при лечении сахарного диабета.

ферментативных реакций:

Гликоген

$-H_3PO_4$ ↑↓ $+H_3PO_4$ (Фосфорилаза)

d-глюкозо-1-фосфат

$+$АТФ ↑↓ (Фосфоглюкомутаза)

Глюкоза ⇄ *d*-глюкозо-6-фосфат

↑↓ (Фосфогексоизомераза)

d-фруктозо-6-фосфат

↑↓ $+$АТФ (Фосфофераза)

d-фруктозо-1,6-дифосфат

↑↓ (Альдолаза)

3-фосфо-*d*-глицериновый альдегид ⇄ Диоксиацетон-фосфат (Изомераза)

$-H_3PO_4$ ↑↓ $+H_3PO_4$

1,3-дифосфо-*d*-глицериновый альдегид

↑↓ $+Co_I$

1,3-дифосфо-*d*-глицериновая кислота

↑↓ $+$АДФ (Фосфофераза)

3-фосфо-*d*-глицериновая кислота

↑↓ (Фосфоглицеромутаза)

2-фосфо-*d*-глицериновая кислота

$+H_2O$ ↑↓ $-H_2O$ (Энолаза)

Фосфо(энол)-пировиноградная кислота

↑↓ $+$АДФ или АМФ (Фосфоэнолфосфофераза)

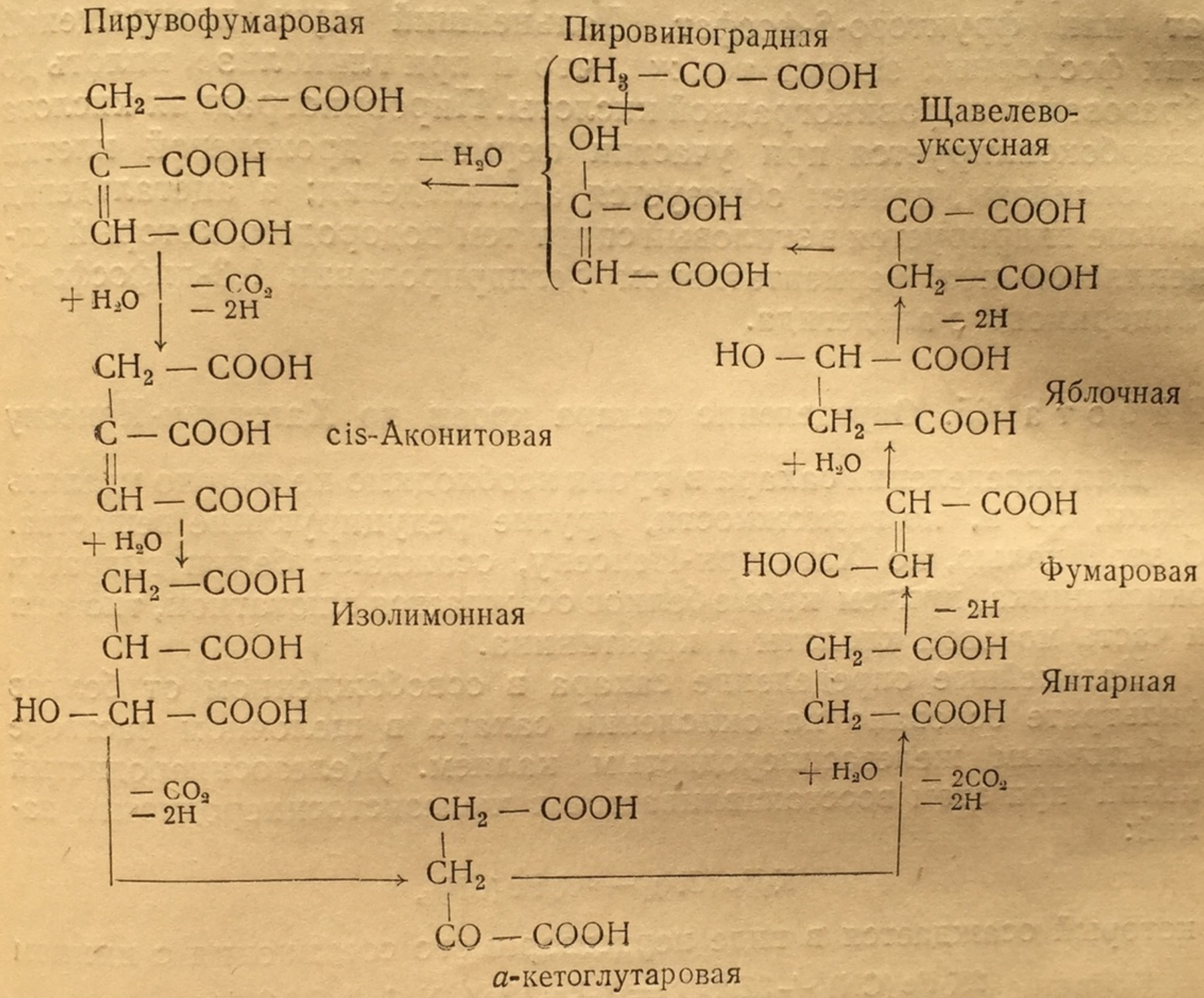
Пировиноградная кислота

↑↓ $+Co_IH_2$ ← 2H (Лактикодегидраза)

Молочная кислота

Молочная кислота, образовавшаяся в результате гликолиза, в аэробных условиях исчезает вследствие того, что меньшая часть ее (около одной пятой) подвергается полному окислительному распаду до углекислоты и воды, а большая часть превращается в гликоген, вероятно, путем обращения реакций гликолиза. Подобное обращение гликолиза требует энергии, которая черпается за счет энергии, освобождающейся в реакциях аэробного окисления молочной кислоты. Таким образом, анаэробная и аэробная фазы обмена углеводов в мышце должны быть теснейшим образом связаны между собою. Эта связь проявляется в том, что в аэробных условиях в мышце анаэробный распад углеводов происходит в меньшем масштабе, т. е. наблюдается аэробное торможение реакций гликолиза.

Окисление молочной кислоты в аэробных условиях начинается с превращения ее путем дегидрирования в пировиноградную кислоту, которая далее подвергается полному окислению до углекислоты и воды. Механизм этого окисления не может считаться достаточно выясненным, но обычно считают наиболее вероятным следующий путь аэробного распада пировиноградной кислоты, включающий цепь реакций, носящую название цикла трикарбоновых кислот.



Все эти процессы окислительного распада пировиноградной кислоты протекают в аэробных условиях, т. е. в присутствии кислорода как конечного акцептора водорода. Перенос водорода с окисляющегося субстрата осуществляется при помощи дегидраз и ряда промежуточных ферментов-переносчиков, причем последним членом такой цепи у большинства организмов является система цитохромов и цитохромоксидазы, непосредственно окисляемая молекулярным кислородом.

Указанный путь окислительного распада, равно как и упомянутый путь переноса водорода, не являются единственными реакциями аэробного обмена углеводов в живой клетке. Следует также иметь в виду, что реакции аэробного окисления входят в цепь реакций обмена не только углеводов, но и жиров и белков.

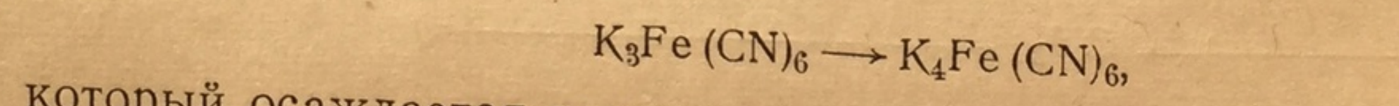
Реакции, во многом сходные с реакциями гликолиза, имеют место при спиртовом брожении углеводов. Спиртовое брожение

представляет анаэробное превращение молекулы моносахарид. в спирт и углекислый газ, которое протекает при действии комплекса ферментов дрожжевых клеток. Русским академиком Л. А. Ивановым и А. Н. Лебедевым впервые было указано на важную роль фосфорных соединений в процессе спиртового брожения. Начальный этап брожения заключается в фосфорилировании молекулы моносахарида, причем *d*-глюкоза и *d*-фруктоза в присутствии АТФ и фермента гексокиназы превращаются в глюкозо-6-фосфат или фруктозо-6-фосфат. Дальнейший путь превращений этих фосфорных эфиров тот же, что и при гликолизе, вплоть до образования пировиноградной кислоты. Пировиноградная кислота декарбоксилируется при участии фермента дрожжевой клетки карбоксилазы, причем образуется ацетальдегид; а ацетальдегид дальше гидрируется в этиловый спирт тем водородом, который отщепляется при ферментативном дегидрировании 1,3-дифосфо-*d*-глицеринового альдегида.

Работа 65. **Определение сахара крови по Хагедорн-Иенсену**

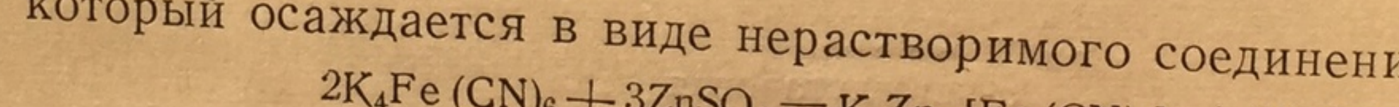
Для определения сахара в крови необходимо не только удалить белки, но и, по возможности, другие редуцирующие вещества. С этой целью, по Хагедорн-Иенсену, осаждают белки гидратом окиси цинка, причем кроме белков осаждается глютатион, тионеин и часть мочевой кислоты и креатинина.

Дальнейшее определение сахара в освобожденном от белков фильтрате основано на окислении сахара в щелочном растворе избыточным железосинеродистым калием. Железосинеродистый калий при этом восстанавливается в железистосинеродистый калий:



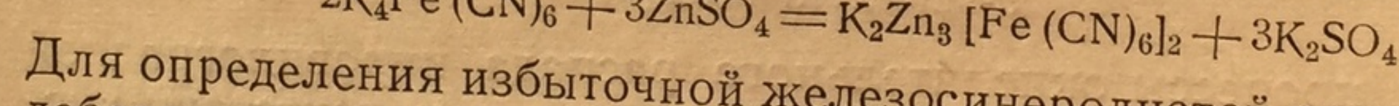
$$K_3Fe(CN)_6 \longrightarrow K_4Fe(CN)_6,$$

который осаждается в виде нерастворимого соединения с цинком

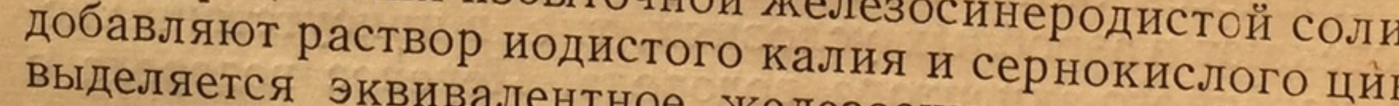


$$2K_4Fe(CN)_6 + 3ZnSO_4 = K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2 + 3K_2SO_4$$

Для определения избыточной железосинеродистой соли к раствору добавляют раствор иодистого калия и сернокислого цинка, причем выделяется эквивалентное железосинеродистой соли количество иода:



$$2K_3Fe(CN)_6 + 2KJ = 2K_4Fe(CN)_6 + J_2$$



$$2K_4Fe(CN)_6 + 3ZnSO_4 = K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2 + 3K_2SO_4$$

После подкисления уксусной кислотой выделившийся иод определяется титрованием с тиосульфатом. По количеству определенного таким образом иода можно судить о количестве оставшегося избыточного $K_3Fe(CN)_6$ и, следовательно, о количестве $K_3Fe(CN)_6$, пошедшем на окисление глюкозы.

Строго говоря, этим способом определяется не только сахар крови (глюкоза), но и некоторые другие редуцирующие вещества, остающиеся в фильтрате после осаждения белков и, следовательно,

результат определения дает сумму редуцирующих веществ, содержащихся в таком фильтрате. Так как, однако, в этой сумме редуцирующих веществ главную часть составляет сахар, то практически ошибка не велика.

С целью, по возможности, устранить эту ошибку, вместо осаждения гидратом окиси цинка применяют осаждение раствором сернокислого кадмия в 1,0 н. серной кислоте. При этом результаты получаются ниже, чем по Хагедорн-Иенсену; однако, и в этом случае наряду с глюкозой определяется некоторое количество креатина и креатинина.

Метод Хагедорн-Иенсена в целом дает ошибку определения до 10%. Несмотря на это, он применим для определения как нормального уровня сахара в крови, так и различных физиологических и патологических отклонений от этого уровня.

В пробирку наливают 1 мл 0,1 н. раствора едкого натра и затем добавляют из микропипетки 0,1 мл крови. Пипетку два-три раза ополаскивают полученной смесью. Затем добавляют 5 мл 0,45%-ного раствора сернокислого цинка. Образуется студенистый осадок гидрата окиси цинка. Пробирку помещают на три минуты в кипящую водяную баню, причем белок осаждается в виде хлопьевидного осадка. Смесь фильтруют в маленькую коническую колбу через смоченный водой кусочек ваты, вложенный в воронку. Пробирку два-три раза споласкивают 3 мл горячей воды, которую также фильтруют через тот же фильтр в ту же колбу.

К полученному прозрачному фильтрату добавляют из микробюретки 2 мл щелочного 0,005 н. раствора $K_3Fe(CN)_6$ (1,65 г $K_3Fe(CN)_6$ и 10,6 г безводной соды в 1 000 мл воды) и нагревают смесь на кипящей водяной бане 15 минут. По охлаждении добавляют 3 мл раствора иодистого калия и сернокислого цинка (5,0 г иодистого калия, 10 г сернокислого цинка, 50 г хлористого натрия и воды до 200 мл; иодистый калий добавляется к этому раствору непосредственно перед опытом), смешивают и подкисляют добавлением 2 мл 3% уксусной кислоты. Добавляют 2 капли 1%-ного раствора крахмала в насыщенном растворе хлористого натрия, причем раствор делается сине-черным, и титруют из микробюретки выделившийся иод 0,005 н. раствором тиосульфата до исчезновения синей окраски.

Опыт проделывают в двух параллельных пробах и берут среднее из пошедших объемов 0,005 н. раствора тиосульфата. Для того, чтобы устранить возможную ошибку за счет редуцирующего действия взятых реактивов, ставят контрольный опыт совершенно так же, как уже описано, но без прибавления крови. Объем 0,005 н. раствора тиосульфата, израсходованный на титрование в основном и в контрольном опыте, переводят в миллиграммы глюкозы, пользуясь следующей таблицей, которая рассчитана на определение сахара в 0,1 мл крови и дает результат в мг глюкозы в 100 мл крови, т. е. в мг %.

Таблица 10

Таблица для определения сахара по способу Хагедорн-Иенсена

мл 0,005н. раствора $Na_2S_2O_3$	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	385	382	379	376	373	370	367	364	361	358
0,1	355	352	350	348	345	343	341	338	336	333
0,2	331	329	327	325	323	321	318	316	314	312
0,3	310	308	306	304	302	300	298	296	294	292
0,4	290	288	286	284	282	280	278	276	274	272
0,5	270	268	266	264	262	260	259	257	255	253
0,6	251	249	247	245	243	241	240	238	236	234
0,7	232	230	228	226	224	222	221	219	217	215
0,8	213	211	209	208	206	204	202	200	199	197
0,9	195	193	191	190	188	186	184	182	181	179
1,0	177	175	173	172	170	168	166	164	163	161
1,1	159	157	155	154	152	150	148	146	145	143
1,2	141	139	138	136	134	132	131	129	127	125
1,3	124	122	120	119	117	115	113	111	110	108
1,4	106	104	102	101	099	097	095	093	092	090
1,5	088	086	084	083	081	079	077	075	074	072
1,6	070	068	066	065	063	061	059	057	056	054
1,7	052	050	048	047	045	043	041	039	038	036
1,8	034	032	031	029	027	025	024	022	020	019
1,9	017	015	014	012	010	008	007	005	003	002

Если, например, на титрование в основном опыте истрачено, в среднем, из двух определений 1,42 мл 0,005 н. раствора тиосульфата, то по таблице этому объему отвечают 102 мг% глюкозы. При титровании контрольного опыта истрачено 1,97 мл раствора тиосульфата, что по таблице соответствует 5 мг% глюкозы. Таким образом, исследуемая кровь содержит 102—5=97 мг% глюкозы.

Содержание сахара в крови человека в норме колеблется в пределах 60—90 мг%, причем сахар распределен приблизительно равномерно между плазмой и эритроцитами.

Работа 66. Изменение содержания сахара в крови при повышенном всасывании глюкозы в кишечнике

При введении в желудочно-кишечный тракт значительного количества сахара наблюдается характерное временное повышение уровня сахара в крови (алиментарная гипергликемия), достигающее в течение часа максимума, после чего происходит снижение уровня сахара до нормы.

У испытуемого натощак определяют содержание сахара в крови (см. работу 65) и затем ему дают в растворе 200 г сахарозы или 100 г глюкозы. После этого через каждые 15 или 30 минут отбирают кровь и определяют содержание сахара. Полученные

результаты изображают графически (см. рис. 10), откладывая по оси абсцисс время, а по оси ординат — найденное содержание сахара в крови в мг%.

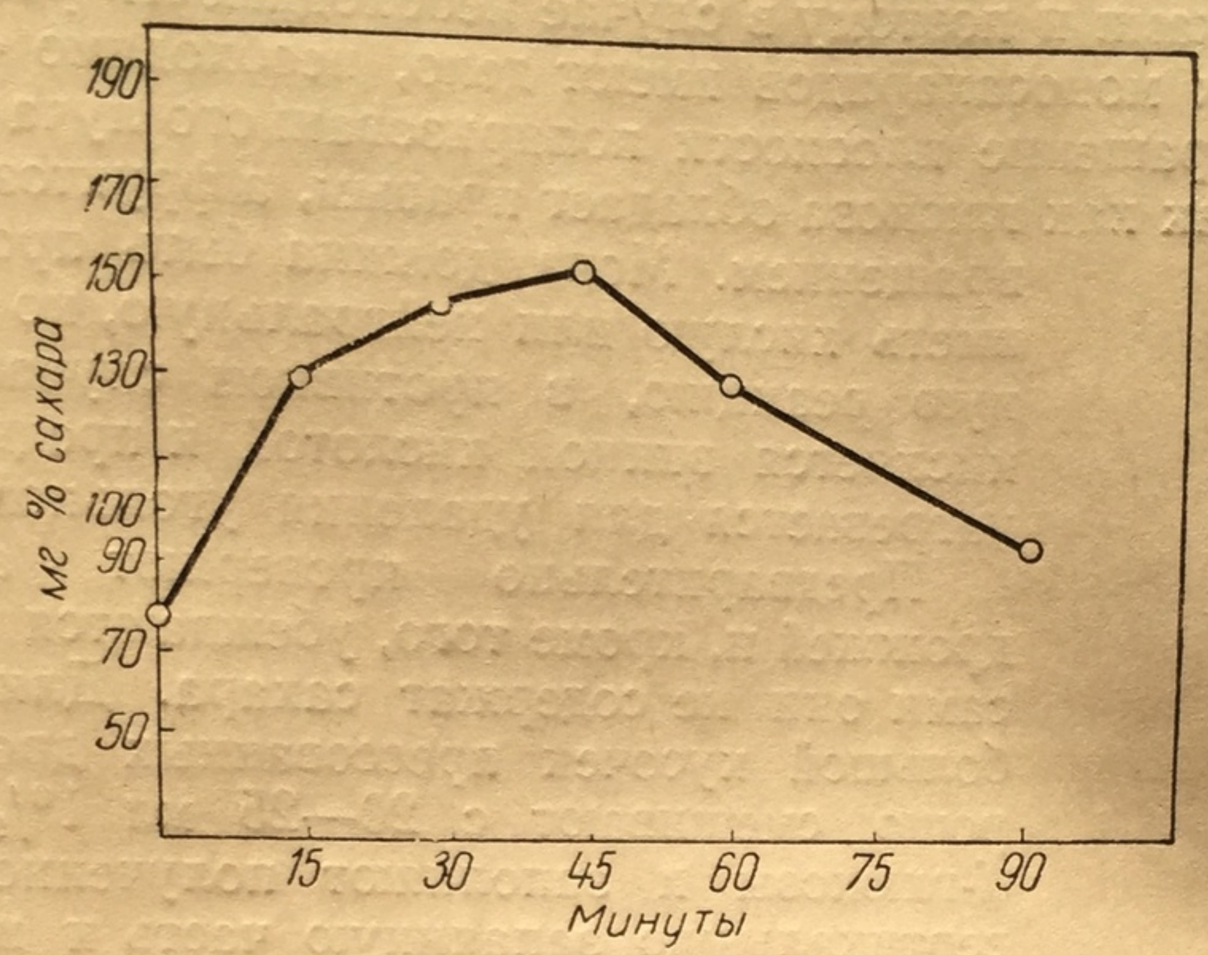


Рис. 10. Кривая сахара крови.

Работа 67. **Открытие сахара в моче**

При нарушениях углеводного обмена и при введении больших количеств сахара может наблюдаться повышение уровня сахара в крови выше нормы (гипергликемия). Если содержание сахара в крови превышает при этом 170 мг%, то сахар появляется в моче (глюкозурия). Обнаружить сахар в моче в этих случаях можно, пользуясь пробами на редуцирующий сахар. При этом следует, однако, иметь в виду, что такие составные части мочи, как мочевая кислота, креатинин, уробилин и уробилиноген, индикан, парные глюкуроновые кислоты, пигменты и белок также дают реакции восстановления. Белок, если таковой присутствует, должен быть осажден или гидратом окиси цинка, или же кипячением мочи, подкисленной уксусной кислотой. Более специфичной на сахар пробой является проба брожением, так как в этом случае другие редуцирующие вещества мочи не мешают правильному открытию.

1. Проба с реактивом Фелинга. 1 мл реактива Фелинга разводят тройным объемом воды, нагревают до кипения и добавляют 5—10 капель исследуемой мочи. При наличии сахара раствор становится желтым или желто-красным от выпадающей закиси меди.

2. Проба с висмутовым реактивом. К 5 мл исследуемой мочи добавляют 20 капель висмутового реактива (см. работу 45) и кипятят две-три минуты. При этом образуется белый осадок фосфатов, который, если присутствует сахар, приобретает желто-коричневую или черную окраску. Такую же окраску приобретает и жидкость.

3. Проба брожением. Проба брожением является наиболее достоверной и надежной для открытия сахара в моче. Однако, как глюкоза, так и фруктоза одинаково легко сбраживаются дрожжами и поэтому в случае необходимости решить, с каким из этих моносахаридов имеют дело, необходимо определить для мочи вращение плоскости поляризованного луча света (работа 46), так как глюкоза обладает правым, а фруктоза — левым вращением. Моча должна быть прозрачной и иметь кислую или нейтральную, но не щелочную реакцию, в противном случае она подкисляется винной кислотой и предварительно нагревается для удаления угольной кислоты.

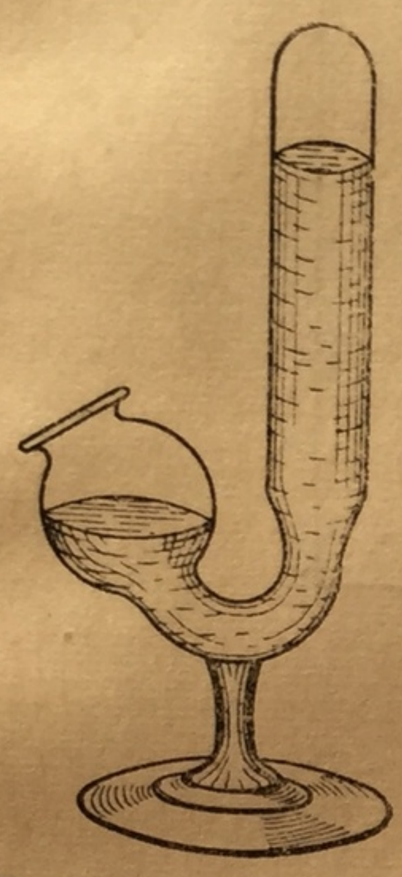


Рис. 11. Бродильная трубка.

Предварительно проверяют активность дрожжей и, кроме того, убеждаются в том, что сами они не содержат сахара. Для этого небольшой кусочек прессованных дрожжей хорошо смешивают с 20—25 мл 1% раствора *d*-глюкозы и заполняют полученной смесью вертикальную запаянную часть и нижнее колено бродильной трубки, изображенной на рис. 11. Затем такой же кусочек дрожжей смешивают с предварительно прокипяченной и охлажденной дестиллированной водой и заполняют вторую бродильную трубку. Оба прибора помещают в термостат при 38°. Если дрожжи активны, в первом приборе уже через 30—60 минут заметно скопление углекислого газа, образующегося в результате брожения глюкозы, выражаемого суммарным уравнением:

$$C_6H_{12}O_6 = 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

Для того, чтобы убедиться в том, что при брожении действительно образуются спирт и CO_2, к жидкости в трубке прибавляют 2—3 мл 20% раствора едкого натра. При смешении наблюдается полное поглощение газа. Затем к щелочной жидкости добавляют несколько капель раствора J в KJ, причем появляется характерный запах иодоформа, образующегося по суммарному уравнению:

$$C_2H_5OH + 6NaOH + 4J_2 = CHJ_3 + HCOONa + 5NaJ + 5H_2O$$

Если дрожжи не содержат сахара, то во второй трубке через 10—20 часов не наблюдается скопления газа (или же ничтожный пузырек газа).

Теперь небольшой кусочек дрожжей хорошо смешивают с 20—25 мл исследуемой мочи (предварительно прокипяченной и охлажденной и, если необходимо, то и подкисленной), заполняют бродильную трубку и ставят прибор в термостат при 38° на 10—20 часов. При наличии сахара наблюдается скопление газа, по объему которого можно составить приблизительное суждение о содержании сахара в исследуемой моче.

Работа 68. **Определение гликогена в печени**

Для определения гликогена в печени кролика берут две навески. В одной определяют количество редуцирующих веществ (сахара), а в другой подвергают гликоген гидролизу, после чего также определяют количество редуцирующих веществ. Разность между этими определениями дает количество глюкозы во взятой навеске, образовавшееся при гидролизе гликогена.

Отвешивают 1 г печени только что убитого кролика и растирают тщательно с 10 мл воды. Смесь переносят в мерную колбу на 200 мл, споласкивают водой и доводят водой до метки. Берут 5 мл полученной жидкости и определяют в них сахар по Хагедорн-Иенсену так, как это описано для 0,1 мл крови (работа 65). Другую такую же навеску печени растирают с 15 мл 2,5% соляной кислоты. Смесь переносят в колбу на 50 мл с обратным воздушным холодильником и ставят на кипящую водяную баню на 1 час. По охлаждении массу переносят в колбу на 200 мл, ополаскивая водой, и доводят водой до метки. Берут 2 мл полученной жидкости, нейтрализуют 1—2 каплями 10%-ного едкого натра и определяют сахар так же, как в 0,1 мл крови.

Из числа миллиграммов глюкозы, определенных в 1 г печени после гидролиза, вычитают миллиграммы глюкозы, найденные в 1 г печени до гидролиза. Полученный результат дает содержание гликогена, выраженное в мг глюкозы. Для пересчета найденного результата в мг гликогена его умножают на 0,9, т. е. на отношение эквивалентных весов гликогена и глюкозы — 162 : 180=0,9. Содержание гликогена в печени около 5—6%.

Работа 69. **Определение молочной кислоты в крови**

Для определения молочной кислоты в экстрактах тканей необходимо предварительно удалить белковые вещества и углеводы. После этого молочная кислота окисляется в ацетальдегид.

$$CH_3 \cdot CHOH \cdot COOH + O = CH_3 \cdot C\begin{matrix} \diagup\!\!\!\!\diagup O \\ \diagdown H \end{matrix} + CO_2 + H_2O$$

Окисление ведется перманганатом в растворе, содержащем сернокислый марганец, причем образуются промежуточные ступени окисления марганца и этим избегается возможность дальнейшего окисления ацетальдегида. Образовавшийся ацетальдегид отгоняется и поглощается раствором бисульфита натрия в виде своего бисульфитного соединения:

$$CH_3 \cdot C\begin{matrix} \diagup\!\!\!\!\diagup O \\ \diagdown H \end{matrix} + NaHSO_3 \rightleftarrows CH_3 \cdot C\begin{matrix} \diagup H \\ -OH \\ \diagdown SO_3Na \end{matrix}$$

Избыток бисульфита окисляется иодом, после чего бисульфитное соединение, неустойчивое уже в слабощелочной среде, разлагается добавлением бикарбоната и выделившийся бисульфит, количество которого эквивалентно связанному ацетальдегиду, оттитровывается иодом:

$$NaHSO_3 + J_2 + H_2O = NaHSO_4 + 2HJ$$

Из вышеприведенных уравнений очевидно, что при этом определении два атома иода отвечают одному молю молочной кислоты, т. е. граммэквивалент иода соответствует 45 г молочной кислоты.

3 мл крови смешивают с 21 мл дестиллированной воды, причем кровь полностью гемолизируется. К жидкости добавляют 3 мл 5%-ного раствора метафосфата натрия и затем 3 мл 0,5 н. серной кислоты. При этом осаждаются белки, осадок которых удаляют фильтрованием. К 20 мл фильтрата (соответствует 2 мл исходной крови) добавляют для осаждения углеводов 2 мл 8%-ного раствора сернокислой меди и 4 мл взвеси гидрата окиси кальция (1 часть $Ca(OH)_2$ и 4 части воды) или сухого порошкообразного $Ca(OH)_2$. Жидкость после такого добавления должна быть окрашена в голубой, но не зеленоватый, цвет. Если этого нет, добавляют еще $Ca(OH)_2$ и доводят объем жидкости до 30 мл. Смесь оставляют стоять на час, время от времени встряхивая, после чего фильтруют или центрифугируют. 15 мл полученного фильтрата (соответствуют 1 мл исходной крови) переносят в колбу *А* прибора (рис. 12). Туда же добавляют 10 мл кислого раствора сернокислого марганца (100 г $MnSO_4$ растворяют в 500 мл воды, добавляют 280 мл концентрированной серной кислоты и доводят водой до 1 000 мл), прибавляют воды до объема 60—80 мл и несколько капиллярных трубок для равномерного кипения. В приемник-поглотитель *В* помещают 5—10 мл 1%-ного раствора бисульфита и столько воды, чтобы при выдавливании жидкости в колонку *С*, она заполняла ее нижнюю часть. Соединив все части прибора и пустив воду в холодильник (рис. 12), пускают водоструйный насос и нагревают колбу *А*

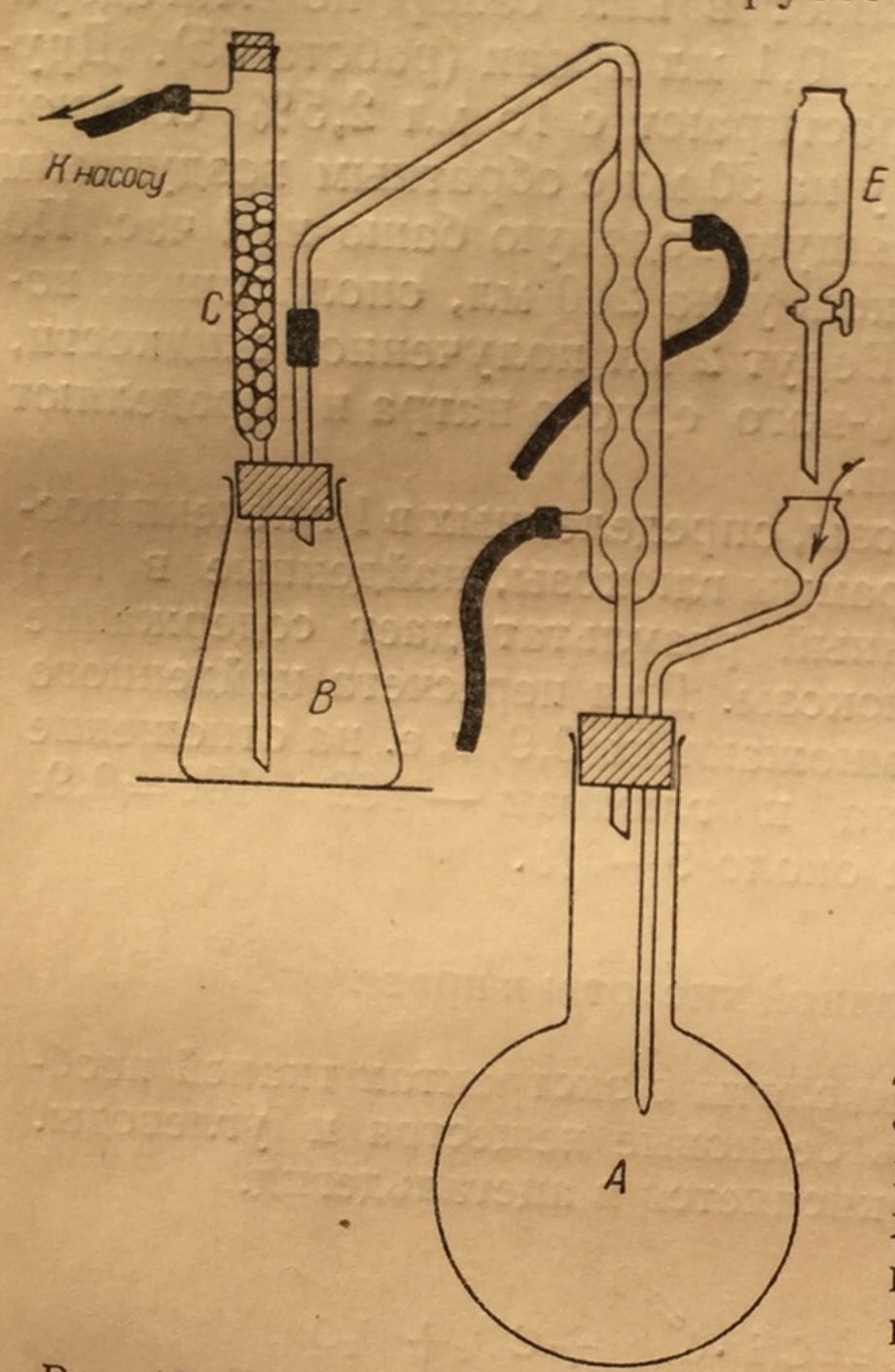


Рис. 12. Прибор для определения молочной кислоты.

до кипения. Затем из делительной воронки *E* приливают по каплям 0,01 н. раствор перманганата до тех пор, пока не прекратится обесцвечивание перманганата. После этого кипячение и просасывание воздуха продолжают еще пять минут для полной дестилляции ацетальдегида из колбы А.

Отъединяют и опускают приемник *B*, промывают колонку *C* дестиллированной водой в приемник и добавляют к жидкости в приемнике несколько капель $1^0/_0$-ного раствора крахмала в насыщенном растворе хлористого натрия. Затем из бюретки прибавляют 0,1 н. раствор иода до полного окисления избыточного бисульфита и появления голубого окрашивания, которое затем доводят до слабоголубого оттенка осторожным добавлением нескольких капель 0,01 н. раствора тиосульфата. После этого прибавляют около 0,5 г сухого бикарбоната натрия и освободившийся бисульфит титруют 0,01 н. или 0,005 н. раствором иода до голубого окрашивания, устойчивого в течение 10 секунд.

Для устранения возможной ошибки за счет нечистоты реактивов и содержания альдегидов в просасываемом воздухе, ставят слепой опыт, результат титрования которого вычитают из основного опыта.

Если в результате определения на окисление бисульфита, полученного при разложении бисульфитного соединения, оказались израсходованными 0,4 мл 0,01 н. раствора иода, то количество молочной кислоты в 1 мл исследуемой крови $0,4 \times 0,45 = 0,18$ мг. или содержание молочной кислоты в крови 18 мг$^0/_0$. Ошибка определения около $5^0/_0$.

В норме, при полном покое, содержание молочной кислоты в крови человека 10—15 мг%. Мышечная деятельность ведет к резкому увеличению содержания молочной кислоты в крови.

ГЛАВА V

ЛИПОИДЫ

> «Основное свойство, характеризующее организмы, отличающее их от неорганизмов, заключается в постоянном деятельном обмене между их веществом и веществом окружающей среды. Организм постоянно воспринимает вещество, превращает его в себе подобное (усвояет, ассимилирует), вновь изменяет и выделяет. Жизнь простейшей клеточки, комка протоплазмы, существование организма слагается из двух превращений: принятия и накопления — выделения и траты вещества»
>
> *К. А. Тимирязев.*

К группе липоидов, или липидов, относят многочисленные естественные соединения весьма разнообразного химического строения. Хотя в строении липоидов и можно усмотреть ту общую особенность, что многие из них являются сложными эфирами многоатомных алкоголей и жирных кислот или фосфорной кислоты, однако, в целом их химический характер слишком различен, чтобы можно было дать строгое структурно-химическое определение этой группе веществ.

Поэтому для характеристики липоидов особое значение имеет их растворимость. Все липоиды, будучи нерастворимыми в воде, растворимы более или менее легко в эфире, петролейном эфире, бензоле, хлороформе, дихлорэтане, трихлорэтилене, четыреххлористом углероде, сероуглероде и некоторых других индиферентных органических растворителях. Кроме того, многие липоиды растворимы в спирте и ацетоне. По своей растворимости липоиды, таким образом, резко отличаются от углеводов и белков. Такая своеобразная растворимость липоидов является свойством практически важным, поскольку она позволяет отделить их от других соединений, находящихся в составе различных тканей и органов.

Характерная и общая для всех липоидов растворимость не исключает, однако, некоторых, довольно заметных, различий в растворимости у различных представителей этой группы веществ. Так, например, нейтральные жиры представляют собою вещества с резко гидрофобным характером, легко растворимы в эфире и значительно труднее в спирте, в то время, как фосфатиды, хотя и нерастворимы в воде, но набухают в ней, образуя эмульсии, и легче растворимы в спирте, чем жиры.

К липоидам относятся следующие соединения: 1) жиры (триглицериды), 2) воска (цериды), 3) каротиноиды и родственные им углеводороды, 4) стероиды, 5) фосфатиды, 6) ацетальфосфатиды, 7) сфингомиэлины и 8) цереброзиды.

ЖИРЫ

Естественные жиры представляют собою сложную смесь, состоящую из разнокислотных триглицеридов. Число различных триглицеридов, входящих в состав естественного жира, зависит как от числа жирных кислот, образующих триглицериды жира, так и от возможности различных изомерных структур. Триглицериды при двух различных жирных кислотах могут существовать в виде двух изомерных соединений:

$$\begin{array}{l} CH_2OOCR^1 \\ | \\ CHOOCR^2 \\ | \\ CH_2OOCR^1 \end{array} \quad \text{и} \quad \begin{array}{l} CH_2OOCR^1 \\ | \\ CHOOCR^1 \\ | \\ CH_2OOCR^2 \end{array}$$

и при трех различных кислотах в виде трех изомерных триглицеридов:

$$\begin{array}{l} CH_2OOCR^1 \\ | \\ CHOOCR^2 \\ | \\ CH_2OOCR^3 \end{array} \quad \begin{array}{l} CH_2OOCR^1 \\ | \\ CHOOCR^3 \\ | \\ CH_2OOCR^2 \end{array} \quad \begin{array}{l} CH_2OOCR^2 \\ | \\ CHOOCR^1 \\ | \\ CH_2OOCR^3 \end{array}$$

Число жирных кислот, входящих в состав естественных жиров, довольно значительно, причем, среди них встречаются как низкомолекулярные, так и высокомолекулярные предельные и непредельные жирные кислоты. За исключением таких кислот, как изовалериановая, найденная в жире дельфина, или таких, как хаульмугровая, гиднокарповая и горлевая, входящих в состав некоторых растительных масел

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ CH_3 \end{array}\!\!>CH - CH_2 - COOH$$

Изовалериановая

$$\begin{array}{l} CH = CH \\ | \\ CH_2 - CH_2 \end{array}\!\!>CH \cdot (CH_2)_{10}\, COOH$$

Гиднокарповая

$$\begin{array}{l} CH = CH \\ | \\ CH_2 - CH_2 \end{array}\!\!>CH\,(CH_2)_{12} COOH$$

Хаульмугровая

$$\begin{array}{l} CH = CH \\ | \\ CH_2 - CH_2 \end{array}\!\!>CH\,(CH_2)_6\, CH = CH\,(CH_2)_4 COOH$$

Горлевая

все жирные кислоты естественных жиров имеют открытую цепь нормального строения, содержащую четное число углеродных атомов.

Таблица 11

Кислоты, входящие в состав естественных жиров и липоидов

а. Насыщенные кислоты

Наименование кислот	Химическая формула	Число атомов углерода
Масляная	$CH_3(CH_2)_2 \cdot COOH$	4
Капроновая	$CH_3(CH_2)_4 \cdot COOH$	6
Каприловая	$CH_3(CH_2)_6 \cdot COOH$	8
Каприновая	$CH_3(CH_2)_8 \cdot COOH$	10
Лауриновая	$CH_3(CH_2)_{10} \cdot COOH$	12
Миристиновая	$CH_3 \cdot (CH_2)_{12} \cdot COOH$	14
Пальмитиновая	$CH_3 \cdot (CH_2)_{14} \cdot COOH$	16
Стеариновая	$CH_3 \cdot (CH_2)_{16} \cdot COOH$	18
Арахиновая	$CH_3 \cdot (CH_2)_{18} \cdot COOH$	20
Бегеновая	$CH_3 \cdot (CH_2)_{20} \cdot COOH$	22
Лигноцериновая	$CH_3 \cdot (CH_2)_{22} \cdot COOH$	24

б. Ненасыщенные кислоты

Наименование кислот	Химическая формула	Число атомов углерода
Деценовая	$CH_2{=}CH(CH_2)_7COOH$	10
Додеценовая	$CH_3CH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	12
Миристолеиновая	$CH_3(CH_2)_3CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	14
Пальмитолеиновая (гексадеценовая) . . .	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	16
Олеиновая	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	18
Петроселиновая	$CH_3(CH_2)_{10}CH = CH(CH_2)_4COOH$	18
Вакценовая	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_9COOH$	18
Линолевая	$CH_3(CH_2)_4CH = CHCH_2CH = = CH(CH_2)_7COOH$	18
Линоленовая	$CH_3CH_2CH = CHCH_2CH = CHCH_2 \cdot \cdot CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	18
Элеостеариновая	$CH_3(CH_2)_3(CH = CH)_3(CH_2)_7COOH$	18
Паринаровая	$CH_3CH_2(CH = CH)_4(CH_2)_7COOH$	18
Тариринновая	$CH_3(CH_2)_7C \equiv C(CH_2)_7COOH$	18
Гадолеиновая	$CH_3(CH_2)_9CH = CH(CH_2)_7COOH$	20

Наименование кислот	Химическая формула	Число атомов углерода
Арахидоновая	$CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_4(CH_2)_2COOH$	20
Цетолеиновая	$CH_3(CH_2)_9CH=CH(CH_2)_9COOH$	22
Эруковая	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{11}COOH$	22
Клупанодоновая	$CH_3CH_2(CH=CHCH_2CH_2)_3\cdot(CH=CHCH_2)_2CH_2COOH$	22
Нервоновая (селахолеиновая)	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{13}COOH$	24

в. Насыщенные и ненасыщенные окси- и оксокислоты

Наименование кислот	Химическая формула	Число атомов углерода
Рицинолевая . .	$CH_3(CH_2)_5CH(OH)CH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$	18
Диоксистеариновая . . .	$CH_3(CH_2)_7CH(OH)CH(OH)(CH_2)_7COOH$	18
Ликановая . . .	$CH_3(CH_2)_3(CH=CH)_3(CH_2)_4CO(CH_2)_2COOH$	18
Оксинервоновая	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{12}CH(OH)COOH$	24
Цереброновая . .	$CH_3(CH_2)_{21}CH(OH)COOH$	24

Эти же кислоты входят в состав и других липоидов: стеридов, фосфатидов, цереброзидов.

Свойства жира зависят, прежде всего, от того, какие из жирных кислот входят в состав образующих его триглицеридов. Такой состав может быть как качественно, так и количественно очень различным. В табл. 12 приведены данные о составе жирных кислот некоторых жиров.

Кроме триглицеридов в состав жира, получаемого из тканей и органов путем экстрагирования жирорастворителями или каким-либо иным путем, входит ряд веществ липоидного характера, составляющих так называемую фракцию неомыляемых жира. В эту фракцию входят углеводороды, каротиноиды, стероиды, витамины, пигменты. Хотя количество этих веществ обычно не велико, од-

Таблица 12

Состав жирных кислот (в %) некоторых жиров

Наименование кислот \ Жир	Говяжий жир	Свиной жир	Жир молока	Касторовое масло	Соевое масло
Масляная	—	—	3,0	—	—
Капроновая	—	—	1,4	—	—
Каприловая	—	—	1,5	—	—
Каприновая	—	—	2,7	—	—
Лауриновая	—	—	3,7	—	—
Миристиновая	2,0	1,2	12,1	—	0,1
Пальмитиновая	27,0	30,4	25,3	—	9,8
Стеариновая	24,0	18,0	9,2	2,0	2,4
Арахиновая	—	—	1,3	—	0,9
Лавролеиновая (додеценовая)	—	—	0,4	—	—
Миристолеиновая	—	0,3	1,6	—	0,1
Пальмитолеиновая	—	3,0	4,0	—	0,4
Олеиновая	43,0	41,0	29,6	8,0	28,9
Вакценовая	1,4	—	—	—	—
Линолевая	2,6	5,6	3,6	3,0	50,7
Линоленовая	—	—	—	—	6,5
Рицинолевая	—	—	—	87,0	—
Диоксистеариновая	—	—	—	0,6	—

нако, присутствие их в жире сильно влияет на некоторые его свойства и пищевую ценность.

Таким образом, естественный жир представляет собой сложную смесь различных триглицеридов и веществ, составляющих фракцию неомыляемых, причем, все эти отдельно взятые составные части естественного жира при большом разнообразии в своем строении не обладают тем резким различием в свойствах, которое открывало бы простой путь к их разделению. Поэтому при изучении как самого жира, так и изменений, с ним происходящих, химическому и физико-химическому исследованию подвергают обычно жир как целое.

Работа 70. Качественное исследование жира

1. Растворимость жира. Исследуют растворимость говяжьего сала и растительного масла при обычной температуре и при нагревании на водяной бане, в воде, спирте, эфире, петролейном эфире, дихлорэтане, хлороформе, бензоле и сероуглероде.

2. Проба на глицерин. Все жиры дают реакции, характерные для глицерина, чем могут быть отличены от схожих с ними, в отношении многих других свойств, жирных кислот. Простейшей реакцией на глицерин является, так называемая, акролеи-

новая проба, основанная на образовании акролеина при отнятии воды от глицерина:

$$CH_2OH \cdot CHOH \cdot CH_2OH = CH_2 = CH - \overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{\underset{\underset{\displaystyle H}{|}}{C}} + 2H_2O$$

Небольшой кусочек говяжьего сала смешивают с кристаллическим кислым сернокислым калием или с борной кислотой, вносят смесь в сухую пробирку и нагревают на пламени горелки. При этом наблюдается резкий своеобразный запах акролеина. В выделяющиеся из пробирки пары вносят бумажку, смоченную аммиачным раствором азотнокислого серебра. Бумажка чернеет в результате восстановления акролеином серебряной соли.

3. Пробы на ненасыщенные жирные кислоты. К 1 мл растительного масла и 1 мл воды в пробирке добавляют 2 капли спиртового раствора иода. После непродолжительного встряхивания содержимое пробирки с раствором крахмала не дает синего окрашивания, т. е. не обнаруживает присутствия свободного иода.

К 1 мл растительного масла добавляют несколько капель бромной воды, которая тотчас обесцвечивается.

Работа 71. Щелочное омыление жира и получение жирных кислот

В небольшой фарфоровый стакан со стеклянной мешалкой помещают 3 г говяжьего сала и 100 мл воды. Добавляют 10 мл 2 н. раствора едкого натра и при помешивании нагревают смесь при слабом кипении около 3 часов. Время от времени доливают воду взамен испарившейся. По окончании омыления выливают содержимое стакана в 300 мл горячей воды и получают густой раствор. Выделяют мыло добавлением к теплому раствору поваренной соли и оставляют на ночь. Отделившееся и застывшее мыло снимают с жидкости, растворяют при нагревании в воде и добавляют к ещетеплому раствору 2 н. раствор серной кислоты до ясно кислой реакции на конго. Выделяющиеся жирные кислоты всплывают на поверхности и затвердевают по охлаждении. Их снимают, расплавляют для удаления остатков минеральной кислоты с небольшим количеством теплой воды и по охлаждении снова снимают и высушивают. С полученными жирными кислотами проделывают следующее:

1) исследуют растворимость жирных кислот в воде, спирте, эфире, петролейном эфире, хлороформе и бензоле; сравнивают растворимость жирных кислот с растворимостью жира;

2) исследуют растворимость жирных кислот в 10%-ном растворе соды;

3) к спиртовому раствору жирных кислот добавляют несколько капель 0,1 н. раствора едкого натра, окрашенного фенолфталеином;

4) акролеиновая проба (проба на глицерин) с жирными кислотами отрицательна.

Работа 72. **Определение температуры плавления жира**

Температура плавления, т. е. температура перехода вещества в капельнообразное состояние, для химически индивидуальных веществ является совершенно определенной константой. Для естественных жиров, т. е. смесей различных триглицеридов, не наблюдается резкой температуры плавления и обычно отмечается начало плавления, когда жир начинает размягчаться, и конец плавления — момент перехода в прозрачную жидкость

Конец тонкого стеклянного капилляра диаметром 1—2 мм наполняют говяжьим жиром, укрепляют капилляр резиновым кольцом на термометре (конец капилляра с жиром у ртутного шарика термометра) и опускают нижний конец термометра в небольшой стакан с водой. Поднимают медленно температуру воды (приблизительно 1° в одну минуту) и отмечают начало и конец плавления жира.

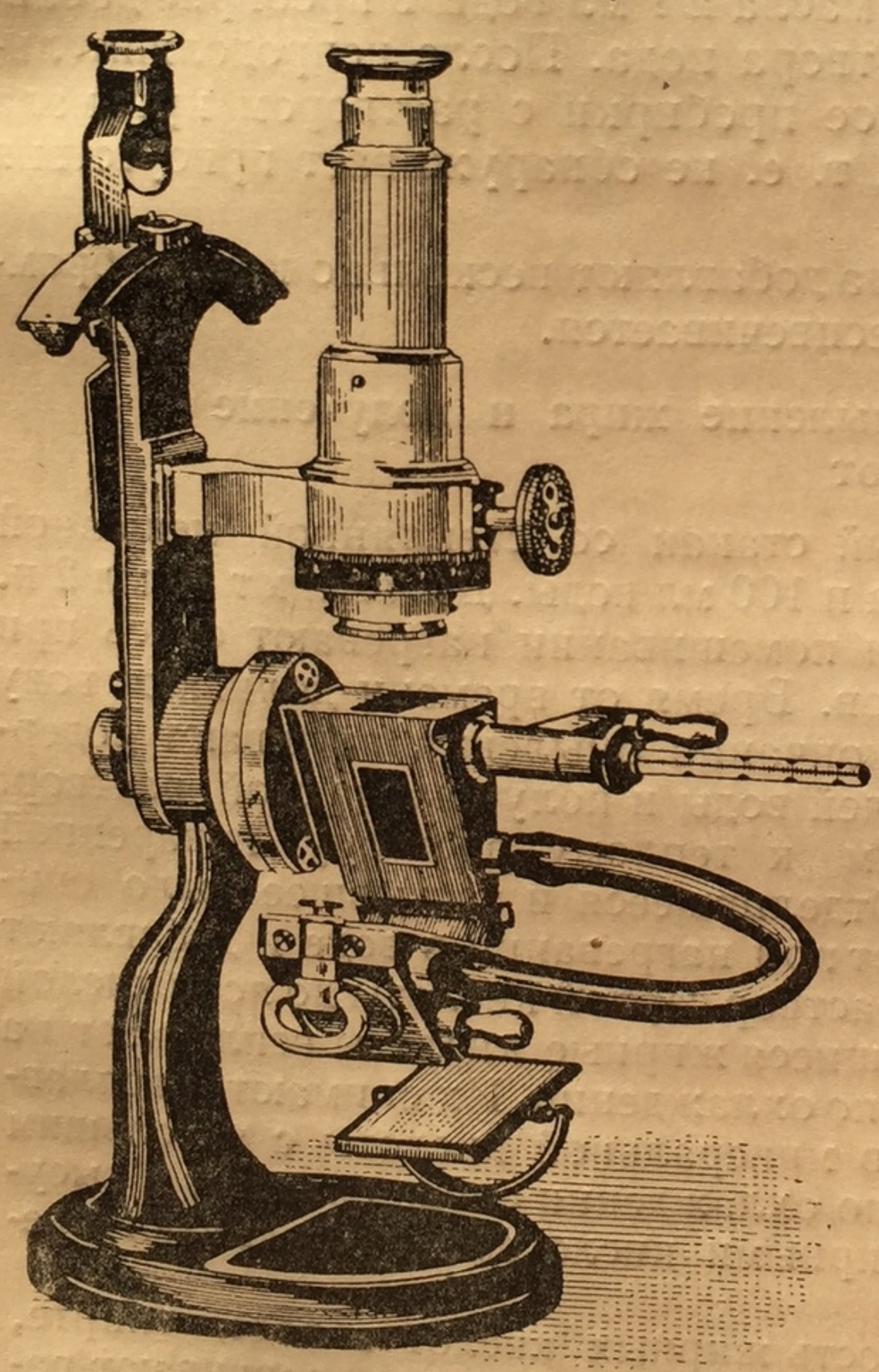


Рис. 13. Рефрактометр.

Для химически индивидуальных веществ температуры плавления и застывания, как правило, совпадают. Этого не наблюдается у жиров и выделенных из них смесей жирных кислот. Для характеристики жиров часто пользуются величиной температуры застывания, а в некоторых случаях, когда жир не имеет определенно выраженной температуры застывания, определяют температуру застывания выделенной из него смеси жирных кислот, или так называемый „титр жира“.

Работа 73. **Определение коэфициента преломления жира с рефрактометром Аббе**

Коэфициент, или показатель, преломления есть функция не только свойств преломляющей среды, но также длины волны света (λ) и температуры. Поэтому показатель преломления относят

к определенной световой волне (обычно спектральная линия D) и определенной температуре и обозначают $\overline{n}_D^{t^\circ}$.

Как видно из рис. 13, рефрактометр Аббе состоит из двух вращающихся призм, снабженных термометром и приспособлением для пропускания через них воды, и зрительной трубы с окуляром и объективом, соединенной с сектором для отсчета показаний прибора. Нижняя призма соединяется с верхней петлей или винтом и может откидываться. Прежде всего рефрактометр включается в систему приборов, как это изображено на рис. 14. Регулируя

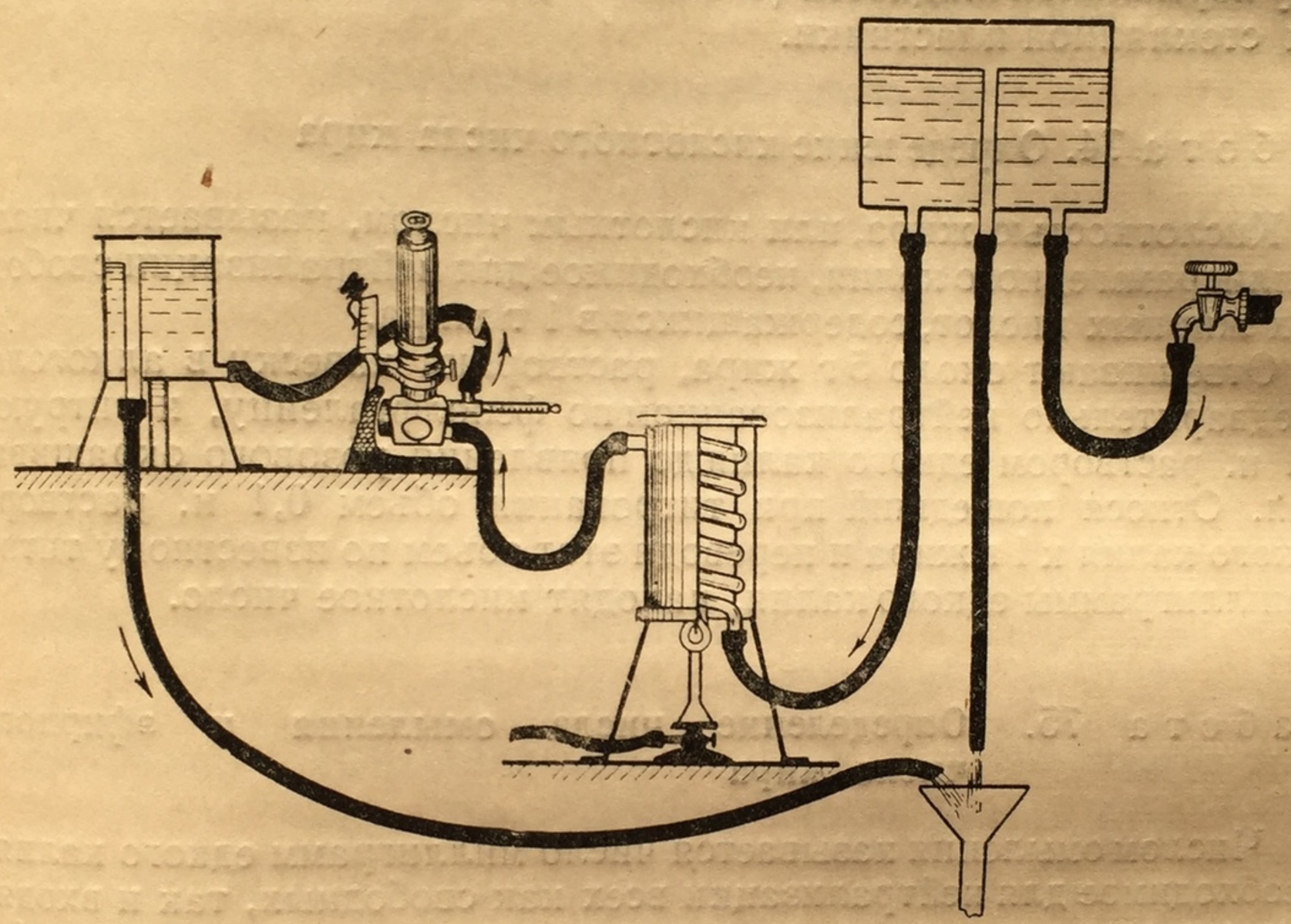


Рис. 14. Схема включения рефрактометра.

скорость тока и нагревание воды, проходящей через призмы рефрактометра, добиваются совершенно постоянной температуры и именно той, при которой желают произвести измерение показателя преломления. Откидывают нижнюю призму рефрактометра и осторожно, стараясь не поцарапать поверхности призмы, наносят на нее несколько капель растительного масла или другого жира, а затем призмы замыкают петлей. При помощи зеркала направляют луч света в систему призм и устанавливают окуляр рефрактометра так, чтобы имеющийся в трубе крест из нитей был совершенно отчетливо виден в поле зрения. Теперь, вращая систему призм с помощью алидады, добиваются того, чтобы граница темной и освещенной части поля зрения совпала с точкой пересечения нитей. Обычно граница между темной и освещенной частью поля зрения размыта в виде цветной полосы. Для уничтожения цветной полосы и получения резкой границы вращают укрепленный около нижней части трубки винт. Благодаря этому вращению перемеща-

ются призмы цветного компенсатора и достигается уничтожение цветной полосы. Теперь уже граница темной и освещенной части поля зрения может быть точно фиксирована на точке пересечения нитей. После этого с помощью лупы производят отсчет по делениям сектора и нониусу алидады и находят коэфициент преломления при данной температуре с точностью до 0,0002.

Следует отметить, что еще до начала работы показания рефрактометра должны быть проверены с помощью приложенной к прибору нормальной жидкости (обычно α-бромнафталин с $n_D^{20°} = 1{,}6582$) или стеклянной пластинки.

Работа 74. Определение кислотного числа жира

Кислотностью жира, или кислотным числом, называется число миллиграмм едкого калия, необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

Отвешивают около 5 г жира, растворяют навеску в алкоголе, предварительно нейтрализованном по фенолфталеину, и титруют 0,1 н. раствором едкого калия до появления розового окрашивания. Относя пошедший при титровании объем 0,1 н. раствора едкого калия к 1 г жира и переводя этот объем по известному титру в миллиграммы едкого калия, находят кислотное число.

Работа 75. Определение числа омыления и эфирного числа жира

Числом омыления называется число миллиграмм едкого калия, необходимое для нейтрализации всех как свободных, так и входящих в состав триглицеридов, жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

В колбу емкостью 250 мл, снабженную обратным холодильником, помещают навеску около 1—2 г жира. Добавляют с помощью пипетки 30 мл 0,5 н. спиртового раствора едкого калия и нагревают на водяной бане при кипении около 50 минут. После этого омыление закончено. Охлаждают содержимое колбы, добавляют несколько капель раствора фенолфталеина и титруют 0,5 н. раствором соляной кислоты до исчезновения красного окрашивания. Таким образом, оттитровывается избыток щелочи, не пошедшей на нейтрализацию жирных кислот.

Так как титр спиртового раствора едкого калия неустойчив, то он заранее не определяется. Общее количество едкого калия, взятого для определения числа омыления, находят путем титрования 30 мл 0,5 н. раствора едкого калия 0,5 н. раствором соляной кислоты по фенолфталеину. Определив этот спуск кислоты, можно, вычитая из него объем кислоты, пошедшей на титрование избытка щелочи, найти объем 0,5 н. раствора соляной кислоты, отвечающий тому количеству едкого калия, которое пошло на нейтрализа-

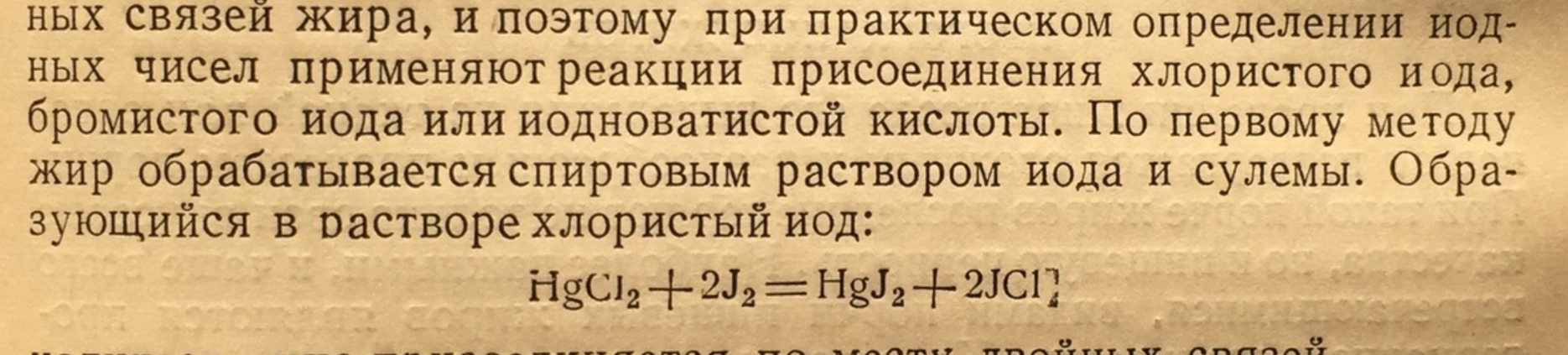
цию жирных кислот. Относя этот объем к 1 г жира и выражая результат (по известному титру 0,5 н. соляной кислоты) в миллиграммах едкого калия, находят число омыления.

Определение эфирного числа. Эфирным числом называется число миллиграмм едкого калия, необходимое для нейтрализации жирных кислот, образующихся при омылении триглицеридов, содержащихся в 1 г жира. Очевидно, что это число может быть найдено, как разность между числом омыления данного жира и его кислотным числом.

Работа 76. **Определение иодного числа жира**

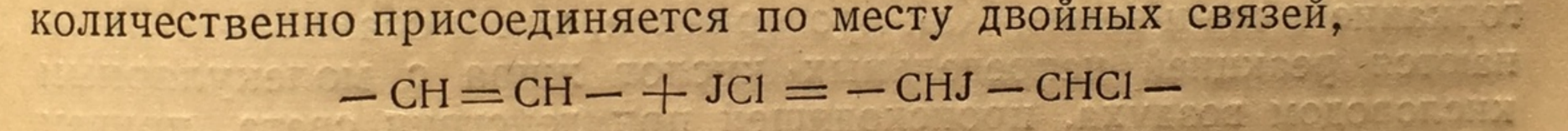
Иодное число является одной из количественных характеристик непредельности жира. Иодным число называется число грамм иода, эквивалентное тому количеству галоида, которое присоединяется к 100 г жира, при обработке последнего галоидным раствором, в условиях того или иного метода.

Сам иод не способен к количественному насыщению непредельных связей жира, и поэтому при практическом определении иодных чисел применяют реакции присоединения хлористого иода, бромистого иода или иодноватистой кислоты. По первому методу жир обрабатывается спиртовым раствором иода и сулемы. Образующийся в растворе хлористый иод:



$$HgCl_2 + 2J_2 = HgJ_2 + 2JCl$$

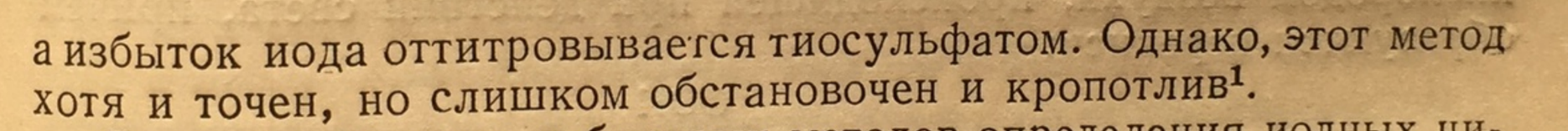
количественно присоединяется по месту двойных связей,



$$-CH=CH- + JCl = -CHJ-CHCl-$$

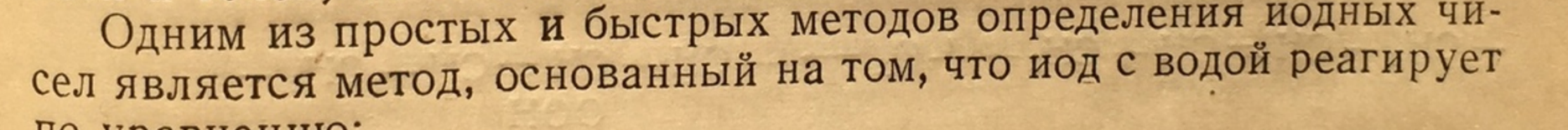
а избыток иода оттитровывается тиосульфатом. Однако, этот метод хотя и точен, но слишком обстановочен и кропотлив[1].

Одним из простых и быстрых методов определения иодных чисел является метод, основанный на том, что иод с водой реагирует по уравнению:



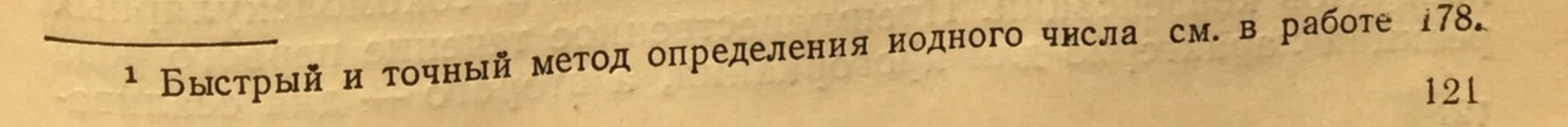
$$J_2 + H_2O = HJ + HOJ$$

В обычных условиях эта реакция почти не идет, но в присутствии веществ, поглощающих иодноватистую кислоту, как это имеет, например, место в случае непредельного жира, образование иодноватистой кислоты протекает количественно в пределах взаимодействия по схеме:



$$-CH=CH- + HOJ = -CH\cdot OH-CHJ-$$

Таким образом, суммарное уравнение метода, написанное в целях простоты изображения для случая реакции с олеиновой кислотой будет:



$$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH + J_2 + H_2O = CH_3(CH_2)_7CH(OH)-CHJ-(CH_2)_7COOH + HJ$$

---

[1] Быстрый и точный метод определения иодного числа см. в работе 178.

Избыток иода, обычно применяемый, оттитровывается раствором тиосульфата.

В коническую колбу емкостью 400 мл помещают навеску жира около 0,2—0,3 г и растворяют в 20—30 мл спирта (если нужно, слабо нагревают на водяной бане). Затем в колбу приливают, точно отмерив, 25 мл 0,2 н. спиртового раствора иода, смешивают, приливают 200 мл воды и хорошо встряхивают. После пятиминутного стояния титруют 0,1 н. раствором тиосульфата, вначале до слабожелтой окраски, а затем добавляют 1 мл раствора крахмала и титруют до исчезновения синей окраски. Объем раствора тиосульфата, пошедшего на титрование, отвечает избыточному иоду.

Теперь 25 мл 0,2 н. спиртового раствора иода оттитровывают 0,1 н. раствором тиосульфата и вычитают из полученного объема раствора тиосульфата объем, найденный ранее. По разности находят объем раствора тиосульфата, соответствующий связанному жиром иоду. Переводя этот объем по известному титру в граммы иода и относя результат к 100 г жира, находят иодное число.

ПРОГОРКАНИЕ ЖИРОВ

При хранении жира после его выделения из тканей или органов он подвергается сложным и разнообразным процессам порчи. При такой порче жиров последние теряют не только свои вкусовые качества, но и пищевую ценность. Наиболее важными, и чаще всего встречающимися, видами порчи пищевых жиров являются прогоркание и осаливание. Как прогоркание, так и осаливание начинаются реакцией непредельных кислот жира с молекулярным кислородом воздуха, происходящей при действии света, причем образуются перекиси:

$$-CH_2-CH=CH-CH_2- + O_2 \longrightarrow -\overset{OOH}{\overset{|}{C}}H-CH=CH-CH_2-$$

$$-CH_2-CH=CH-CH_2- + O_2 \longrightarrow -CH_2-\overset{OOH}{\overset{|}{C}}=CH-CH_2-$$

$$-CH_2-CH=CH-CH_2- + O_2 \longrightarrow -CH_2-\overset{O-O}{\overset{|\quad|}{CH-CH}}-CH_2-$$

Впервые на образование перекисных соединений при явлениях автооксидации различных ненасыщенных соединений указал акад. А. Н. Бах. Для разработки методов исследования перекисей в жирах много сделано А.А. Зиновьевым.

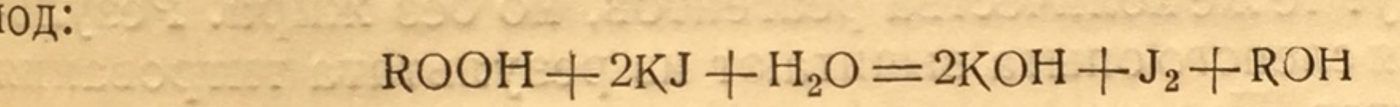
Дальнейшие окислительные процессы протекают в направлении окислительного распада жирных кислот триглицеридов жира с образованием оксикислот, альдегидов, кетонов, алкоголей, низкомолекулярных кислот, CO_2 и H_2O и одновременно — в направлении реакции уплотнения с образованием высокомолекулярных продуктов конденсации. Преимущественное течение первого рода реакций характерно для прогоркания, а второго — для осалива-

ния. Направление отдельных реакций прогоркания и интенсивность всего процесса в целом зависит от ряда причин и прежде всего от состава жирных кислот триглицеридов жира (большая или меньшая ненасыщенность жира). Кроме того, большую роль играет состав неомыляемой фракции жира, которая может содержать как вещества, ускоряющие окисление, так и ингибиторы окисления жира. Наконец, существенную роль играют свет, присутствие влаги, температура, наличие тех или иных примесей.

Для исследования прогоркания жира служат качественные и количественные определения продуктов прогоркания, которыми может быть охарактеризована степень прогорклости. Перекиси появляются на наиболее ранних стадиях окисления, позднее, но уже в самом начале прогоркания, появляются эпигидриновый альдегид, альдегиды, кетоны и кислоты.

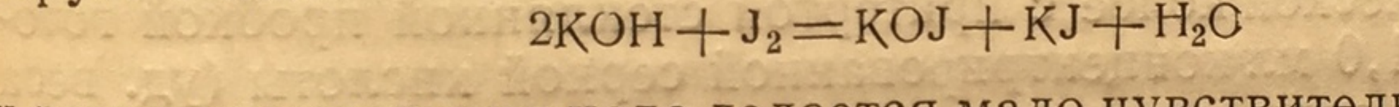
Работа 77. **Открытие перекисей в прогоркающем жире**

1. Реакция с иодистым калием и иодистоводородной кислотой. При встряхивании жира, содержащего перекиси, с раствором иодистого калия выделяется иод:



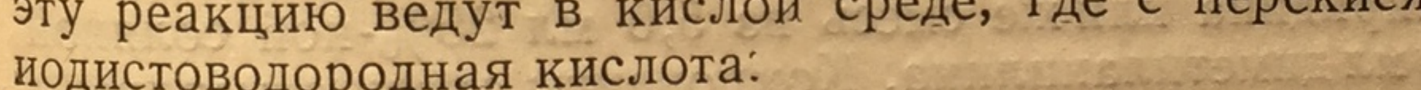
$$ROOH + 2KJ + H_2O = 2KOH + J_2 + ROH$$

Так как при этом одновременно образуется KOH, то иод реагирует с ним:



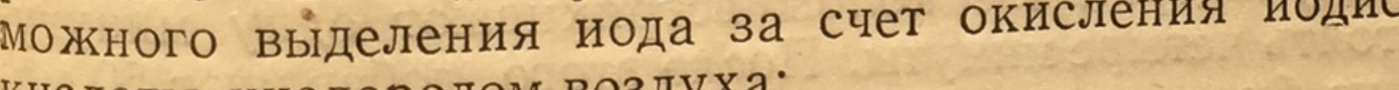
$$2KOH + J_2 = KOJ + KJ + H_2O$$

и реакция выделения иода делается мало чувствительной. Поэтому эту реакцию ведут в кислой среде, где с перекисями реагирует иодистоводородная кислота:



$$ROOH + 2HJ = J_2 + H_2O + ROH$$

Реакция при этом очень чувствительна, но необходимы контрольные опыты для устранения могущей быть ошибки из-за возможного выделения иода за счет окисления иодистоводородной кислоты кислородом воздуха:



$$2HJ + O = J_2 + H_2O$$

Прогоркающий жир растворяют в хлороформе или дихлорэтане и встряхивают полученный раствор с двойным объемом 10%-ного раствора иодистого калия, подкисленного уксусной кислотой, с добавкой 2—3 капель раствора крахмала. Появляется синее окрашивание от выделяющегося иода. Эту же реакцию повторяют без добавления уксусной кислоты, с нерастворенным жидким жиром и ставят опыт без жира.

2. Реакция на перекиси с пероксидазой. Эта проба на перекиси основана на окислении веществ гваяковой смолы кислородом перекисей, в присутствии фермента пероксидазы (см. работу 37). Реакция специфична и достаточно чувствительна.

К 5 г исследуемого жира добавляют несколько капель 10%-ного

раствора крови, 10 капель свежеприготовленного спиртового раствора гваяковой смолы и 5 мл воды и хорошо встряхивают в течение минуты. При наличии в жире перекисей появляется голубое окрашивание. При добавлении к смеси равного объема спирта эта окраска делается более отчетливой.

Работа 78. Количественное определение перекисей в жире (определение активного кислорода)

1. Навеску исследуемого жира около 1 г растворяют в конической колбе в смеси из 7,5 мл ледяной уксусной кислоты и 5 мл хлороформа. Добавляют к раствору 1 мл свежеприготовленного насыщенного раствора иодистого калия, встряхивают содержимое колбы в течение 5 минут. Затем добавляют 50 мл воды и выделившийся иод оттитровывают 0,01 н. раствором тиосульфата в присутствии крахмала, как индикатора, до исчезновения синей окраски. Определение ведут в двух параллельных опытах. Кроме того, для того, чтобы избежать ошибки за счет нечистоты реактивов и возможного окисления HJ кислородом, ставят слепой опыт, в котором берут те же количества реагентов, но без жира. Результат титрования слепого опыта вычитают из результата титрования основных опытов. Перекисное число выражают числом миллилитров 0,01 н. раствора тиосульфата, расходуемых на 1 г жира.

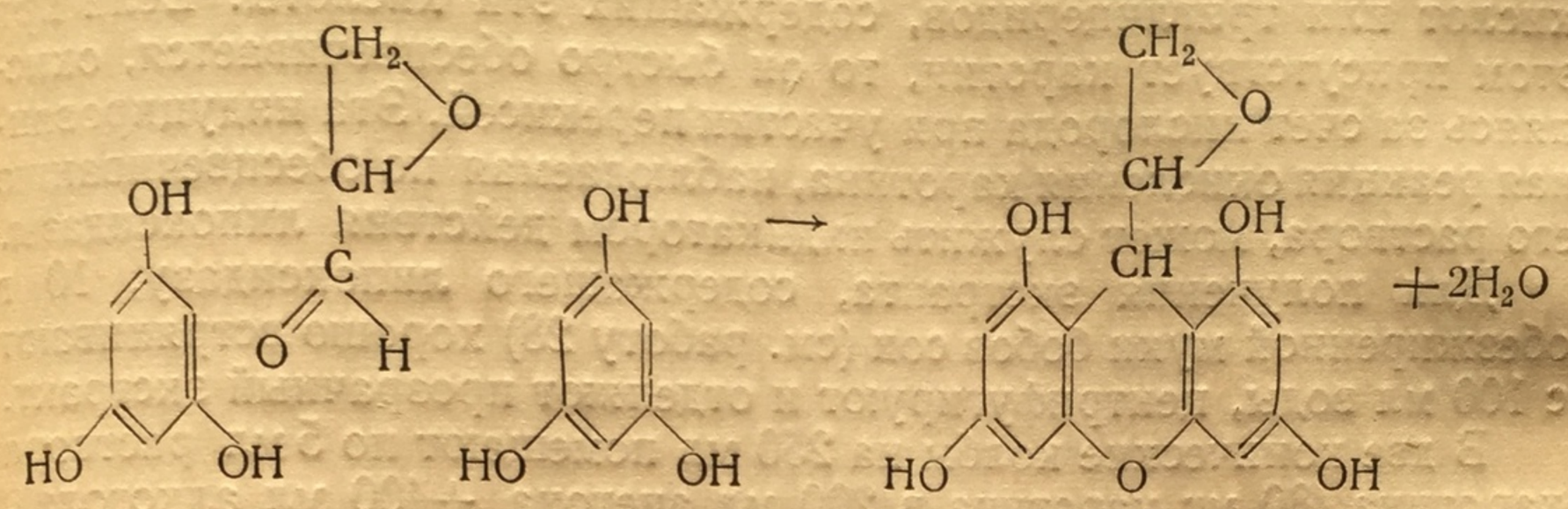
2. В конической колбе с притертой стеклянной пробкой готовят смесь из 1,0 мл концентрированной серной кислоты (уд. веса 1,83) и 1,0 мл воды и по охлаждении добавляют 1,0 мл диметиланилина или пиридина или же смесь из 5,0 мл 25%-ной соляной кислоты и 1,0 мл диметиланилина. Компоненты смеси отмеривают с помощью микропипетки или микробюретки. Смесь охлаждают и к ней добавляют раствор жира (навеска около 1 г) в 5 мл хлороформа. Затем к смеси добавляют 1 мл насыщенного раствора иодистого калия, содержимое колбы встряхивают одну минуту и оставляют стоять четыре минуты. После этого, добавляют 50 мл воды, а затем из бюретки избыток 0,01 н. раствора тиосульфата (5—10 мл) и, прибавив 1 мл 1% раствора крахмала, оттитровывают избыток тиосульфата 0,01 н. раствором иода. По разности находят количество 0,01 н. раствора тиосульфата, связанное выделившимся за счет перекисей иодом. Так же, как в предыдущем случае, определение ведут в двух параллельных опытах и ставят слепой опыт. Перекисное число выражают числом миллилитров 0,01 н. раствора тиосульфата, расходуемых на 1 г жира.

Сравнивают результаты определения перекисей, полученные по обоим из описанных методов.

Работа 79. Открытие эпигидринового альдегида

Летучий эпигидриновый альдегид, образующийся при прогоркании жира, находится в нем в связанном состоянии, повидимому, в виде ацеталя. При действии концентрированной соляной кис-

лоты он освобождается и конденсируется с добавленным к жиру флороглюцином с образованием краснокрашенного вещества:



Вместо флороглюцина могут быть применены также резорцин, дающий красный продукт конденсации, или пирогаллол, дающий зеленое окрашивание.

2—3 г прогоркшего жира расплавляют в пробирке и встряхивают с равным объемом концентрированной соляной кислоты (уд. веса 1,19). По охлаждении добавляют 2 мл 1%-ного эфирного раствора флороглюцина или резорцина и снова хорошо встряхивают. При этом солянокислый слой окрашивается в розовый или красный цвет.

Работа 80. **Открытие альдегидов в прогорклом жире**

Альдегиды отгоняются и открываются в дестиллате с помощью реакции с фуксинсернистой кислотой. Последняя готовится растворением 5 г фуксина в 100 мл воды и этот раствор смешивается с раствором 12 г кристаллического сульфита натрия в небольшом объеме воды и затем с 100 мл 1,0 н. соляной кислоты. Объем доводят до 1 000 мл и оставляют на сутки, после чего реактив готов к употреблению.

Для открытия альдегидов 5 г прогоркшего жира смешивают в колбе емкостью 50 мл с 20 мл насыщенного раствора хлористого натрия, добавляют небольшой кусочек пемзы и отгоняют с прямым холодильником 10 мл жидкости. К дестиллату добавляют 2 мл раствора фуксинсернистой кислоты, причем образуется красноватое окрашивание. При добавлении 2 мл хлороформа и встряхивании низшие альдегиды до валерианового переходят в водный слой, а высшие, начиная с капронового,— в слой хлороформа.

Работа 81. **Липоксидаза**

Образование перекисей в жире может происходить не только под воздействием кислорода воздуха и света, но может быть и результатом ферментативной реакции, катализируемой липоксидазой. Липоксидаза — фермент, находящийся в некоторых растительных и животных тканях, обладает максимальной активностью при pH = 7—9 и температуре 20—30°.

Липоксидаза в присутствии кислорода воздуха ускоряет процесс образования перекисей олеиновой, линолевой и линоленовой кислот или триглицеридов, содержащих эти кислоты. Если при этом присутствует каротин, то он быстро обесцвечивается, окисляясь за счет кислорода при участии перекисей. Эта индуцированная реакция окисления каротина, наблюдаемая по обесцвечиванию его раствора, может служить индикатором действия липоксидазы.

Для получения экстракта, содержащего липоксидазу, 10 г обезжиренной муки бобов сои (см. работу 28) хорошо встряхивают с 100 мл воды, центрифугируют и отделяют прозрачный экстракт.

В две конические колбы на 250 мл помещают по 5 мл раствора каротина (80 мг каротина в 200 мл ацетона +400 мл алкоголя). Затем в первую добавляют 2—3 капли свежего хлопкового или льняного масла или ненасыщенной жирной кислоты. Добавляют в обе колбы по 100 мл воды и по 2 мл фосфатного буфера (60 мл 0,5 м. Na_2HPO_4+40 мл 0,5 м. KH_2PO_4) и затем по 5 мл водного экстракта, содержащего липоксидазу. Смешивают содержимое колб. При этом желтая окраска каротина в первой колбе начинает быстро исчезать в то время, как во второй колбе обесцвечивание происходит лишь очень медленно (около 20 часов).

Работа 82. **Определение активности липоксидазы**

Для количественной оценки действия липоксидазы определяют образующиеся в результате ферментативной реакции перекиси ненасыщенных жирных кислот. Опыт ведут при оптимальной для действия липоксидазы температуре 30°.

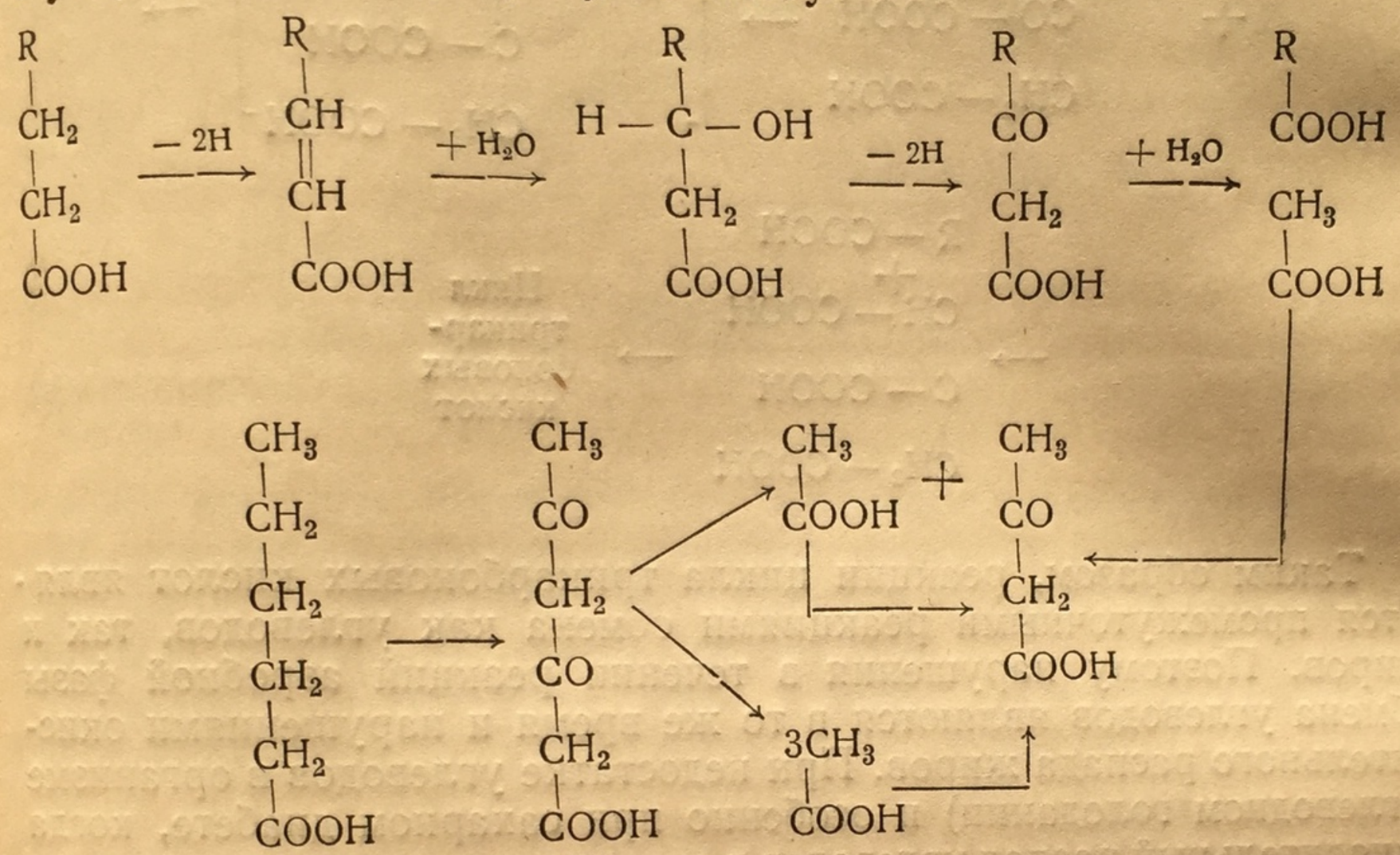
В колбу с хорошей мешалкой, помещенную в термостат при 30°, вносят 10 мл водного экстракта соевой муки, 40 мл воды и 100 г свежего, не содержащего перекисей, хлопкового или льняного масла и хорошо перемешивают 10 (или 20) минут. К полученной эмульсии добавляют для лучшего ее разделения хлористого натрия и центрифугируют. Отбирают прозрачное масло и определяют в нем содержание перекисей (см. работу 78). Параллельно определяют количество раствора тиосульфата в слепом опыте, который ведут так же, но без добавления раствора фермента. Результаты выражаются числом мл 0,01 н. раствора $Na_2S_2O_3$ на 100 г масла.

ОБМЕН ЖИРОВ

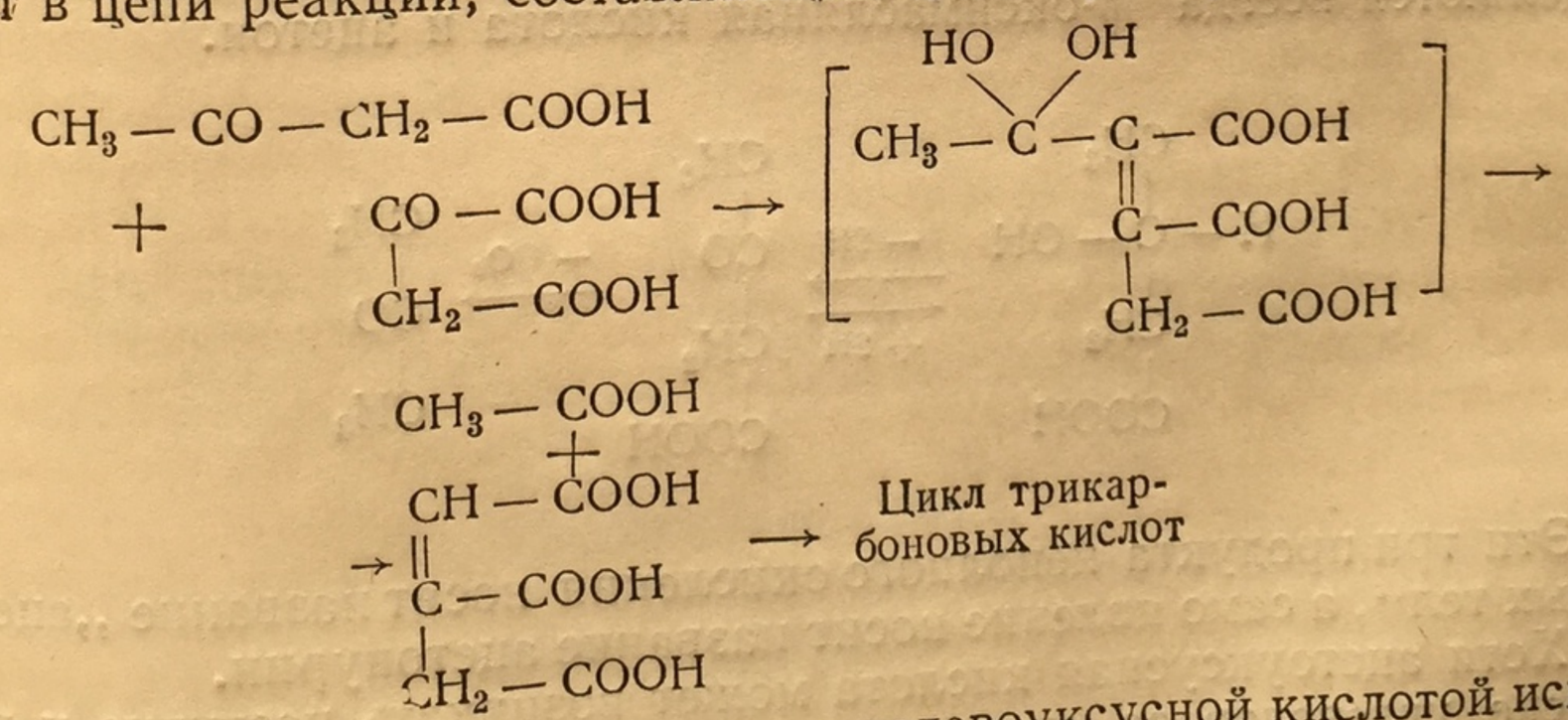
Биологическая роль жиров разнообразна, но, главным образом, жиры используются в организме как энергетический запас. Такое значение жиров особенно велико у гомойотермных животных, у которых компенсация тепловых потерь идет за счет постоянного выделения тепловой энергии, источником которой являются преимущественно реакции катаболической фазы обмена жиров.

Катаболическая фаза обмена жиров включает реакции окислительного распада фосфорного эфира глицерина и жирных кислот,

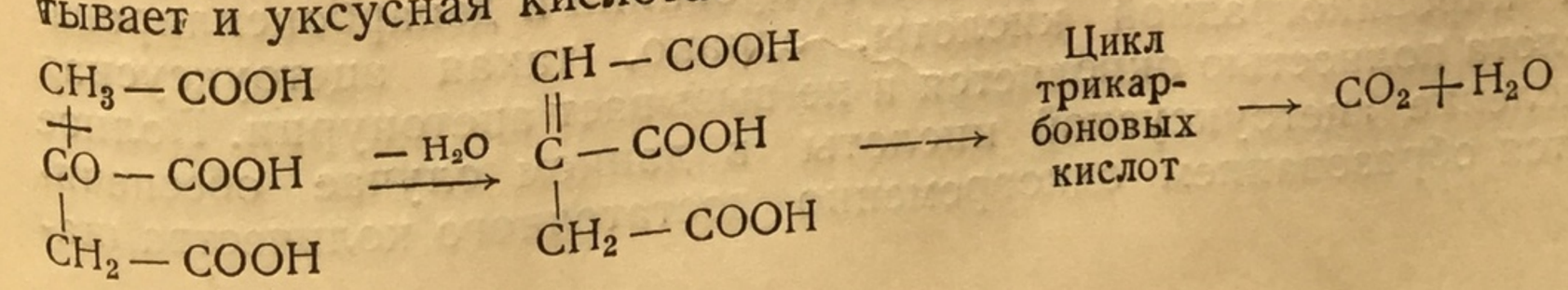
образующихся при ферментативном расщеплении тканевого жира. Фосфорный эфир глицерина окисляется через диоксиацетонфосфат, фосфоглицериновый альдегид и пировиноградную кислоту до конечных продуктов обмена, т. е. до CO_2 и H_2O. Жирные кислоты в печени подвергаются β-окислению с образованием β-кетокислот или поликетокислот, которые, далее, превращаются в уксусную и ацетоуксусную кислоту.



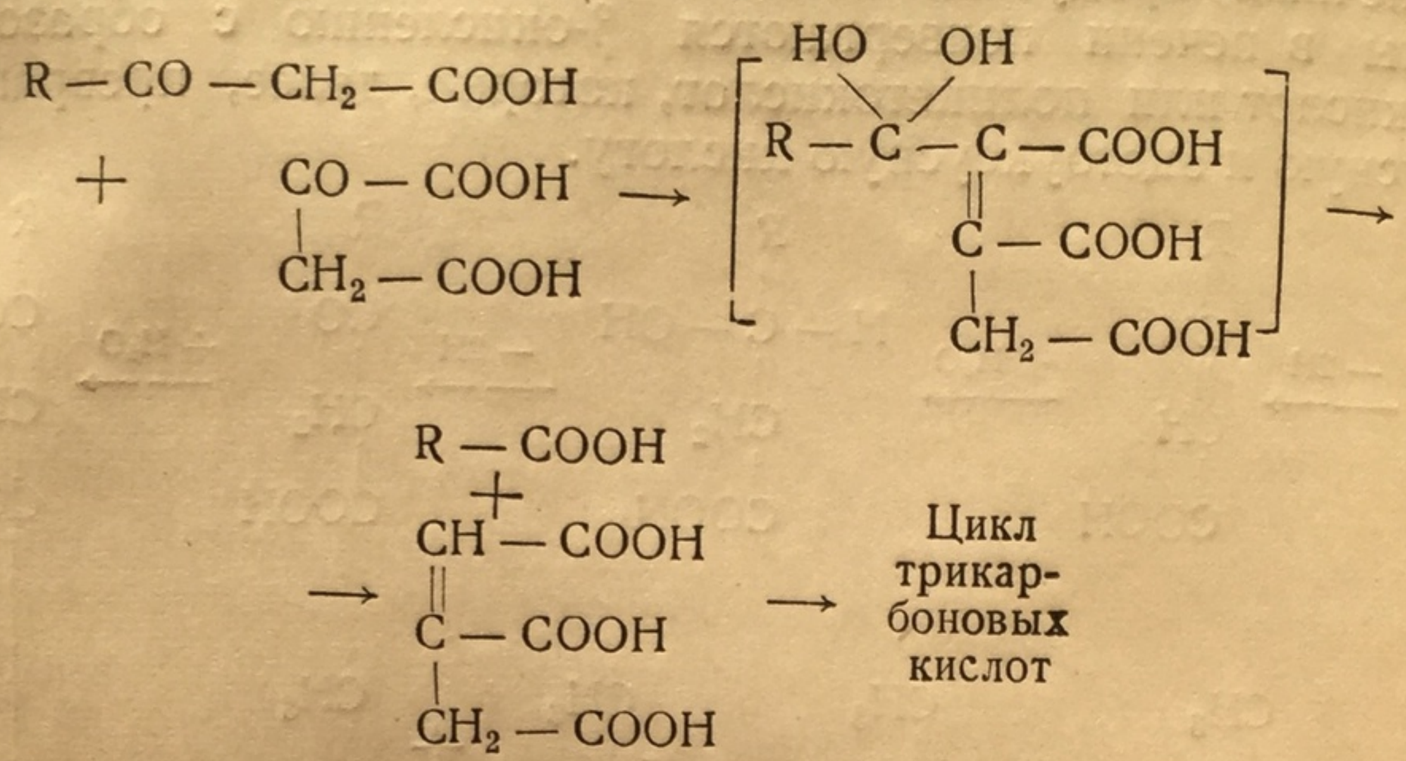
Образовавшаяся ацетоуксусная кислота, являющаяся конечным продуктом β-окисления в печени, конденсируется в мышцах и почках с щавелевоуксусной кислотой с образованием cis-аконитовой кислоты и, таким образом, дальнейшее окисление протекает в цепи реакций, составляющих цикл трикарбоновых кислот.



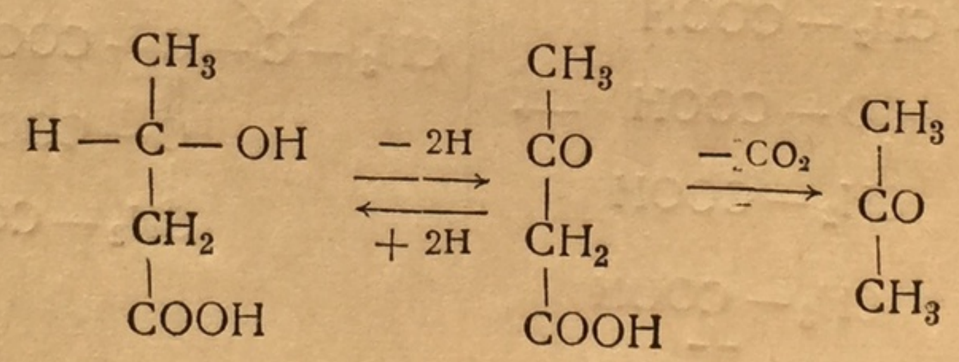
Подобную же конденсацию с щавелевоуксусной кислотой испытывает и уксусная кислота:



В мышцах β-окисление заканчивается на образовании β-кетокислот, которые затем подобно ацетоуксусной конденсируются с щавелевоуксусной кислотой:



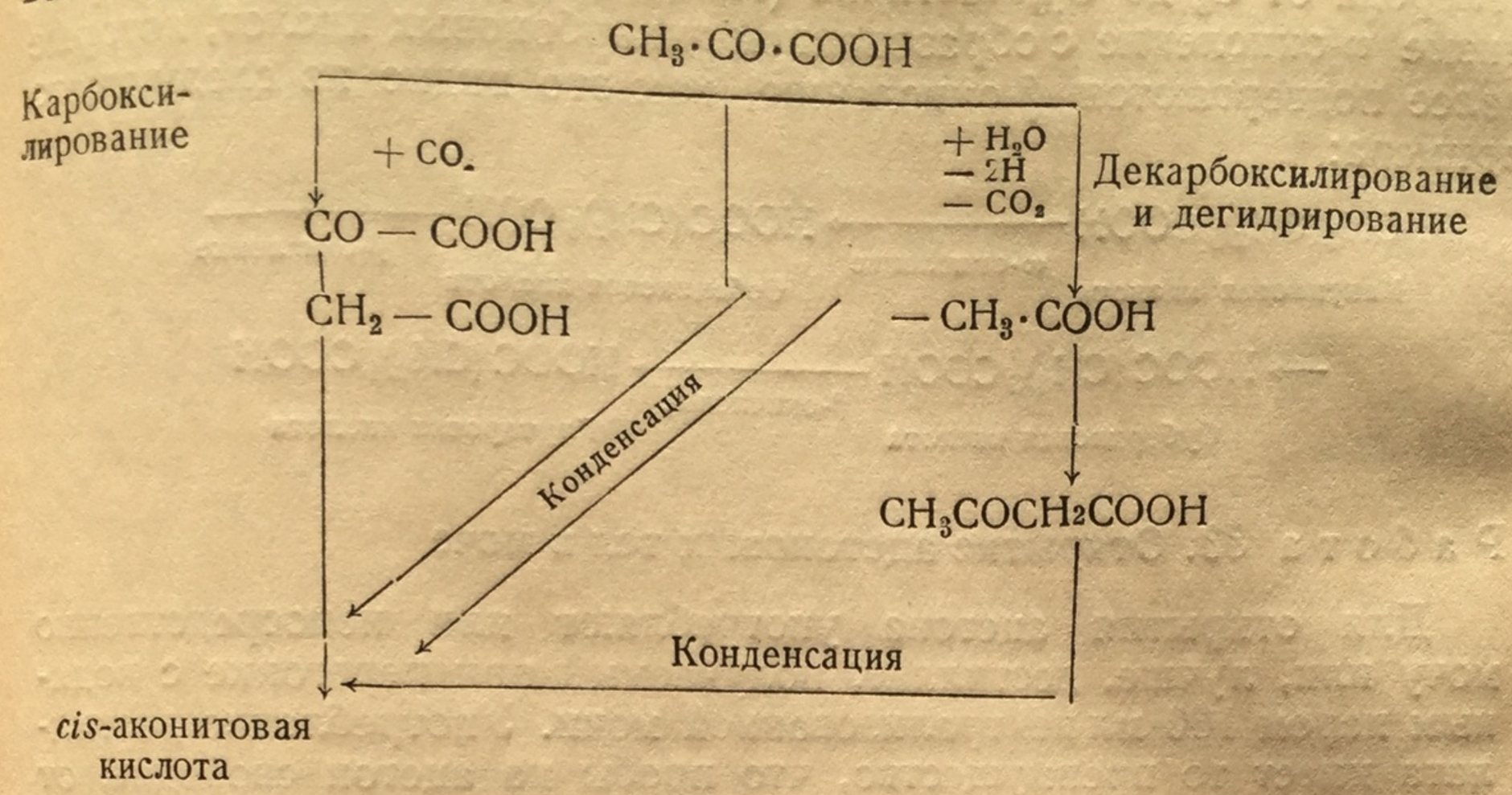
Таким образом, реакции цикла трикарбоновых кислот являются промежуточными реакциями обмена как углеводов, так и жиров. Поэтому нарушения в течении реакций аэробной фазы обмена углеводов являются в то же время и нарушениями окислительного распада жиров. При недостатке углеводов в организме (углеводном голодании) и особенно при сахарном диабете, когда окислительный распад углеводов в организме нарушен, происходит накопление в крови избыточного количества ацетоуксусной кислоты, окисление которой в таких случаях замедлено. Это приводит, с одной стороны, к ацидозу, а с другой — к выделению ацетоуксусной кислоты с мочой. Кроме ацетоуксусной кислоты с мочой выделяются всегда β-оксимасляная кислота и ацетон.



Эти три продукта неполного окисления носят название „ацетоновых тел", а само явление носит название ацетонурии.

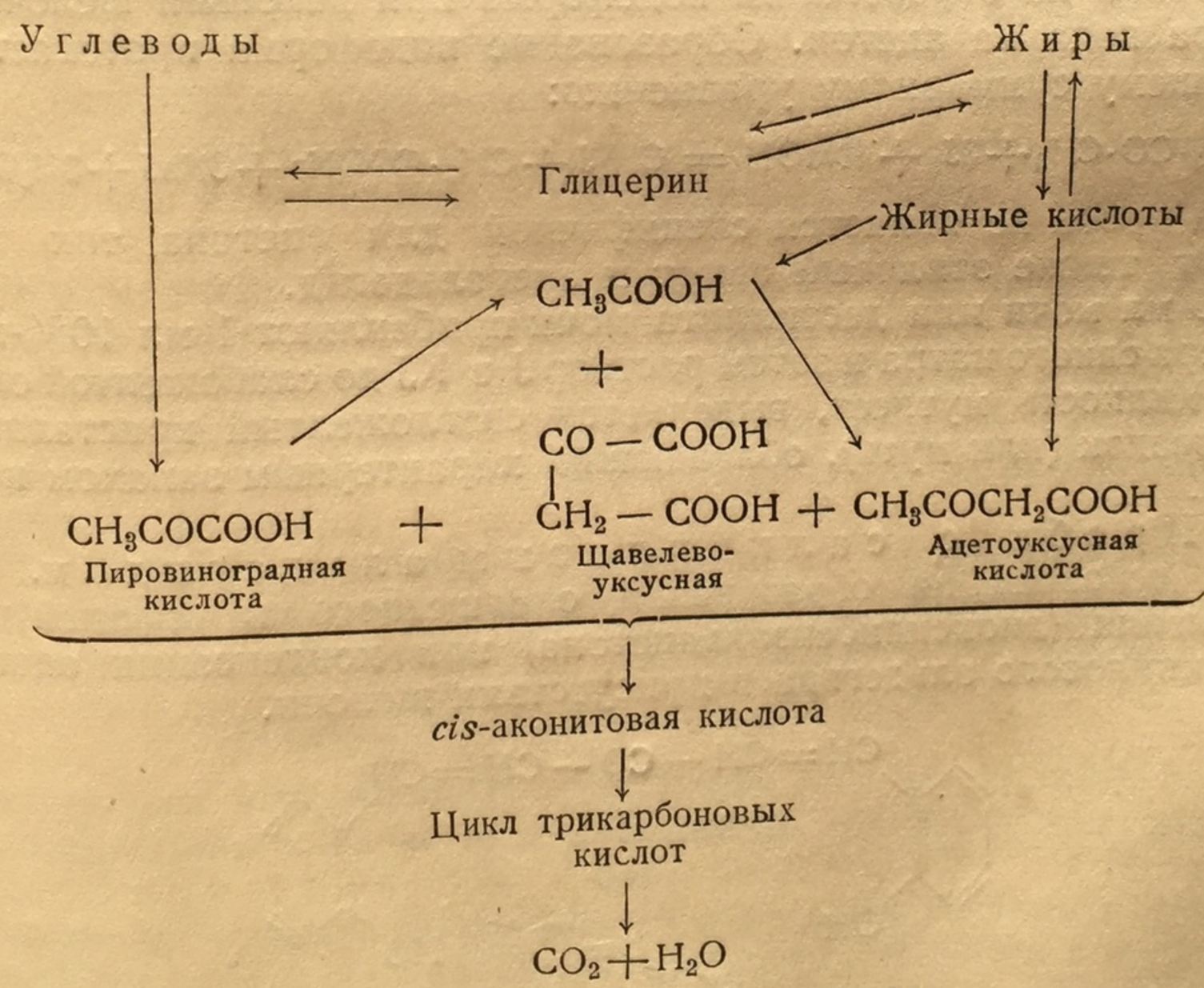
Хотя ацетоуксусная кислота может возникать частично и при обмене углеводов за счет конденсации двух молекул уксусной кислоты, образующейся при дегидрировании и декарбоксилировании пировиноградной кислоты, однако, такая ацетоуксусная кислота полностью окисляется и не вызывает ацетонурии. Полное окисление ацетоуксусной кислоты в данном случае обеспечивается образованием одновременно достаточного количества ща-

велевоуксусной кислоты:



Поэтому повысить интенсивность окисления ацетоуксусной кислоты и уменьшить ацетонурию можно введением в организм углеводов (антикетогенное действие углеводов); наоборот, устранение углеводов из пищи усиливает ацетонурию.

Схематически взаимная связь реакций обмена углеводов и жиров может быть изображена следующим образом:



β-окисление представляет собою главный, но не единственный, путь окислительного распада жирных кислот в организме. Так, например, жирные кислоты с средней длиной цепи атомов

углерода от C_8 до C_{10} частично (около 10%) испытывают в организме ω-окисление с образованием дикарбоновых кислот, которые далее подвергаются β-окислению, как это видно из следующего примера:

$$\underset{\text{Каприновая кислота}}{CH_3(CH_2)_8COOH} \xrightarrow[\omega\text{-окисление}]{} \underset{\text{Себациновая кислота}}{HOOC(CH_2)_8COH} \xrightarrow[\beta\text{-окисление}]{}$$

$$\rightarrow \underset{\text{Субериновая кислота}}{HOOC(CH_2)_6COOH} \xrightarrow[\beta\text{-окисление}]{} \underset{\text{Глутаровая кислота}}{HOOC(CH_2)_4COOH}$$

Работа 83. **Открытие ацетоновых тел в моче**

Для открытия ацетона употребляют или непосредственно мочу или, лучше, дестиллат, получаемый при перегонке с водяным паром 100 мл нейтрализованной мочи. Употребление дестиллата имеет то преимущество, что пробы на ацетон свободны от многих (но не от всех) помех, вызываемых другими веществами, находящимися в моче. При дестилляции ацетоуксусная кислота декарбоксилируется и в дестиллат переходит как преформированный ацетон мочи, так и ацетон, образующийся из ацетоуксусной кислоты.

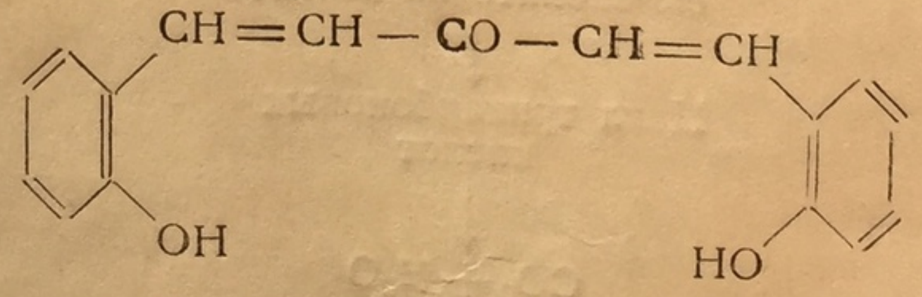
1. Проба на образование иодоформа. Проба основана на образовании иодоформа при действии щелочного раствора иода на ацетон. Образование иодоформа протекает по следующему суммарному уравнению:

$$CH_3 \cdot CO \cdot CH_3 + 3J_2 + 4NaOH = CH_3J + CH_3 \cdot COONa + 3NaJ + 3H_2O$$

Эта проба не является специфичной для ацетона, так как ее дают также этиловый спирт и ацетальдегид.

К 5 мл мочи или дестиллата мочи прибавляют 1 мл 10%-ного раствора едкого натра и затем раствор J в KJ до слабожелтой окраски. Жидкость мутнеет, выделяется светложелтый кристаллический осадок (или муть), обладающий характерным запахом иодоформа.

2. Проба с салициловым альдегидом. Эта проба основана на образовании окрашенного в красный цвет соединения (диоксидибензальацетона) при конденсации ацетона и салицилового альдегида в присутствии щелочи.



К 5 мл мочи или дестиллата мочи добавляют 5 капель 10%-ного раствора салицилового альдегида в спирте. Затем в жидкость вносят небольшой кусочек твердого едкого натра и нагревают на

водяной бане при 70°. При этом образуется окрашенное в пурпурно-красный цвет кольцо. Окраска постепенно изменяется в черную.

3. Проба с нитропруссидом натрия. Проба основана на образовании окрашенного соединения при действии на ацетон в щелочной среде нитропруссида натрия [$Na_2Fe(CN)_5NO$]. Такое же окрашивание дают алкоголь, ацетальдегид и ацетоуксусная кислота. С последней окраска получается даже скорее и более интенсивной. Кроме того, в моче всегда присутствует креатинин, который с нитропруссидом натрия в щелочной среде также дает красное окрашивание (см. работу 146). Окраска, получающаяся в последнем случае, отличается от окрашивания с ацетоном тем, что при подкислении уксусной кислотой в случае ацетона окраска изменяется в вишнево-красную и затем лишь медленно переходит в фиолетовую и синюю, а в случае креатинина окраска при подкислении переходит в желтую. Чтобы избежать указанной помехи, пробу делают с дестиллатом мочи.

К 5 мл мочи и к 5 мл дестиллата мочи прибавляют по 5—10 капель свежеприготовленного 10%-ного раствора нитропруссида натрия и затем по 1 мл 10%-ного раствора едкого натра. Появляется рубиново-красное окрашивание. Жидкость в той и другой пробе подкисляют и наблюдают за изменением окраски.

4. Проба на ацетоуксусную кислоту основана на образовании красного окрашивания, которое дает ацетоуксусная кислота с хлорным железом. Очень похожие окраски дают родановая, муравьиная и уксусная кислоты и некоторые фенолы. Характерным для ацетоуксусной кислоты является то, что окраска исчезает при нагревании или продолжительном стоянии.

К 10 мл мочи прибавляют по каплям 5—10% раствор хлорного железа до прекращения выпадения осадка фосфата железа ($FePO_4$). Осадок отфильтровывают и к фильтрату добавляют еще несколько капель раствора хлорного железа. В присутствии ацетоуксусной кислоты появляется виннокрасное окрашивание, исчезающее при кипячении раствора.

Для открытия ацетоуксусной кислоты необходимо употреблять свежую мочу, так как ацетоуксусная кислота довольно быстро исчезает, превращаясь в ацетон и угольную кислоту

$$CH_3 \cdot CO \cdot CH_2 \cdot COOH \longrightarrow CH_3 \cdot CO \cdot CH_3 + CO_2$$

Еще быстрее этот процесс происходит при нагревании, поэтому прокипяченная моча не дает реакций на ацетоуксусную кислоту.

5. Открытие β-оксимасляной кислоты основано на том, что после удаления из мочи ацетона и ацетоуксусной кислоты β-оксимасляная кислота окисляется и образовавшийся ацетон обнаруживается цветной реакцией.

15—25 мл мочи разбавляют вдвое водой, подкисляют уксусной кислотой и испаряют на водяной бане до объема 10 мл. Жидкость делят на две части. К первой добавляют 1 мл 3% перекиси водорода,

осторожно нагревают и охлаждают. Затем делают реакцию с нитропруссидом натрия в обеих пробах. В случае наличия в моче β-оксимасляной кислоты реакция значительно интенсивнее в первой пробе, где образовался ацетон при окислении β-оксимасляной кислоты.

β-Оксимасляная кислота появляется в моче всегда в сопровождении ацетоуксусной кислоты. Присутствие ее в моче вероятно, если моча, освобожденная от сахара или не содержащая сахара, имеет левое вращение. Удельное вращение β-оксимасляной кислоты $[\alpha]_D^{20^\circ} = -24{,}12^\circ$.

Работа 84. **Количественное определение ацетона в моче**

Ацетон отгоняется из мочи с током воздуха и поглощается в избытке щелочного раствора иода. При этом образуется иодоформ:

$$3J_2 + 6NaOH = 3NaOJ + 3NaJ + 3H_2O$$

$$CH_3 \cdot CO \cdot CH_3 + 3NaOJ = CH_3 \cdot CO \cdot CJ_3 + 3NaOH$$

$$CH_3 \cdot CO \cdot CJ_3 + NaOH = CHJ_3 + CH_3 \cdot COONa$$

или суммарно:

$$CH_3 \cdot CO \cdot CH_3 + 3J_2 + 4NaOH = CHJ_3 + 3NaJ + CH_3 \cdot COONa + 3H_2O$$

По окончании поглощения ацетона жидкость подкисляется и выделившийся избыточный иод

$$NaOJ + NaJ + H_2SO_4 = J_2 + Na_2SO_4 + H_2O$$

оттитровывается тиосульфатом. Таким образом, определяется количество иода, израсходованное на реакцию с ацетоном. Как явствует из приведенных уравнений, один граммэквивалент иода отвечает одной шестой граммоля ацетона и, следовательно, 1 мл 0,1 н. раствора иода отвечает 0,9666 мг ацетона.

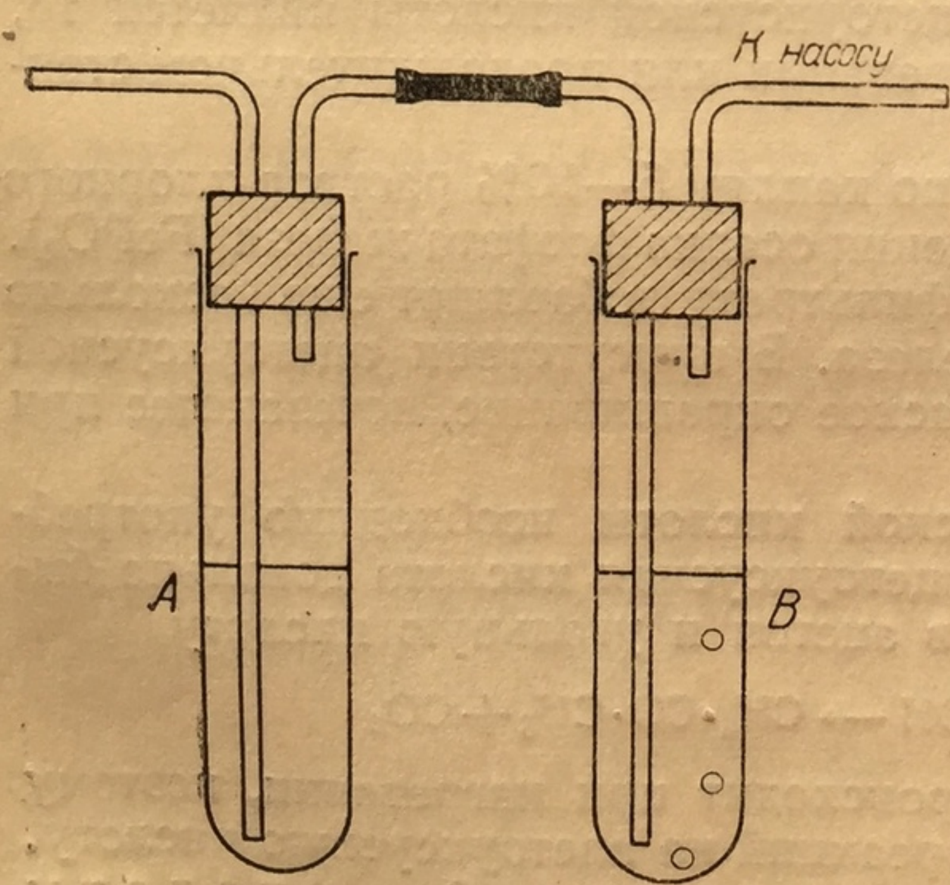


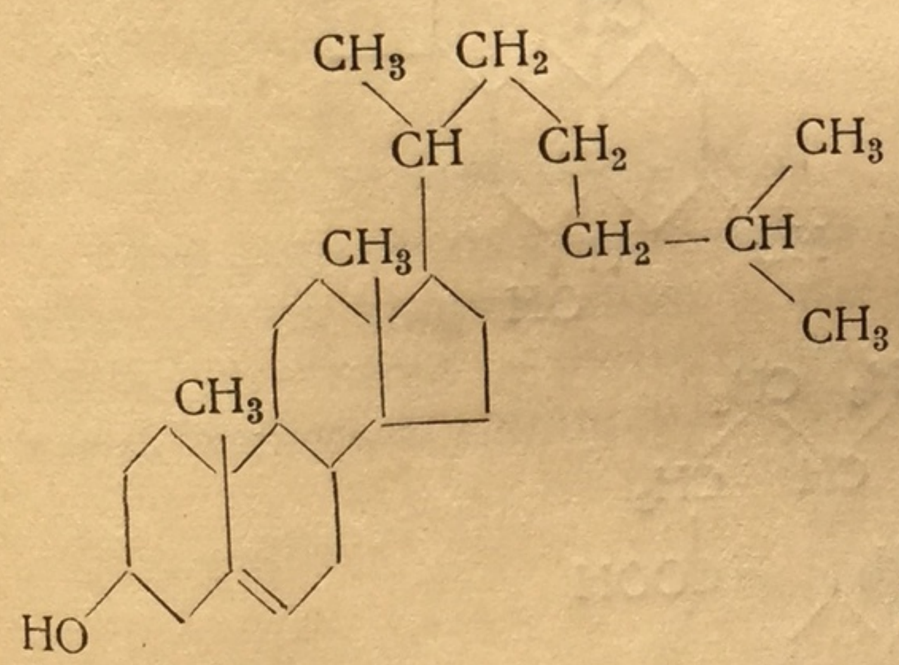
Рис. 15. Прибор для определения ацетона.

В цилиндр *A* прибора (рис. 15) помещают 20 мл мочи, 0,2 г щавелевой кислоты, 10 г хлористого натрия и несколько капель парафинового масла или керосина для уменьшения вспенивания. Затем в цилиндр *B* помещают 20 мл 0,1 н. раствора иода, 20 мл 20%-ного

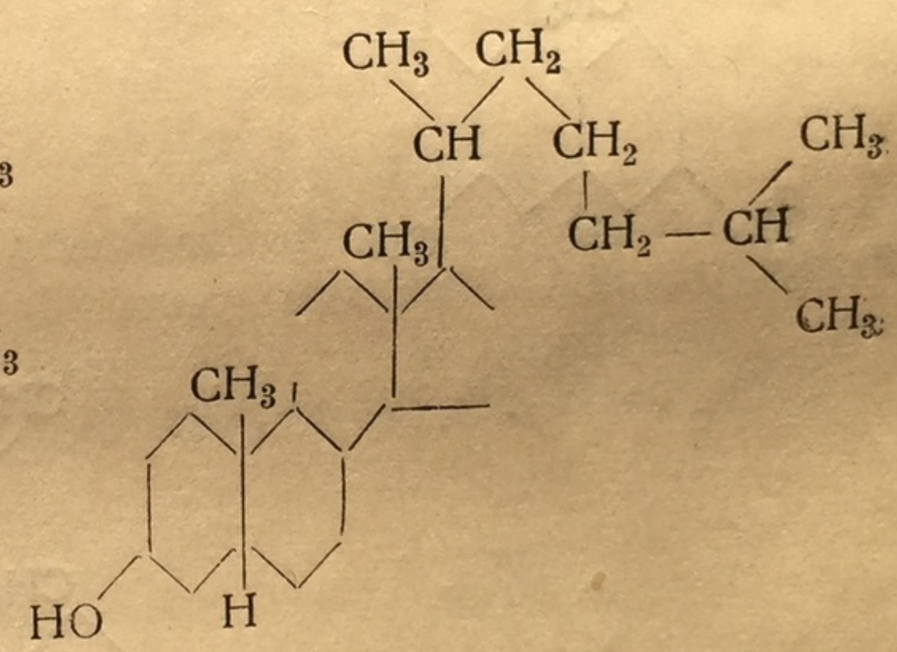
раствора едкого натра и 60 мл воды. Цилиндры соединяют, как показано на рис. 15, и просасывают воздух с помощью водоструйного насоса в течение 30 минут. После этого прибор разбирают и содержимое цилиндра *В* подкисляют 20%-ной серной кислотой до заметной реакции на конго. Выделившийся иод оттитровывают тиосульфатом в присутствии крахмала. Определяют количество связанного иода и вычисляют содержание ацетона в мг в 100 мл исследуемой мочи (в мг %) и в суточном объеме мочи.

СТЕРОИДЫ

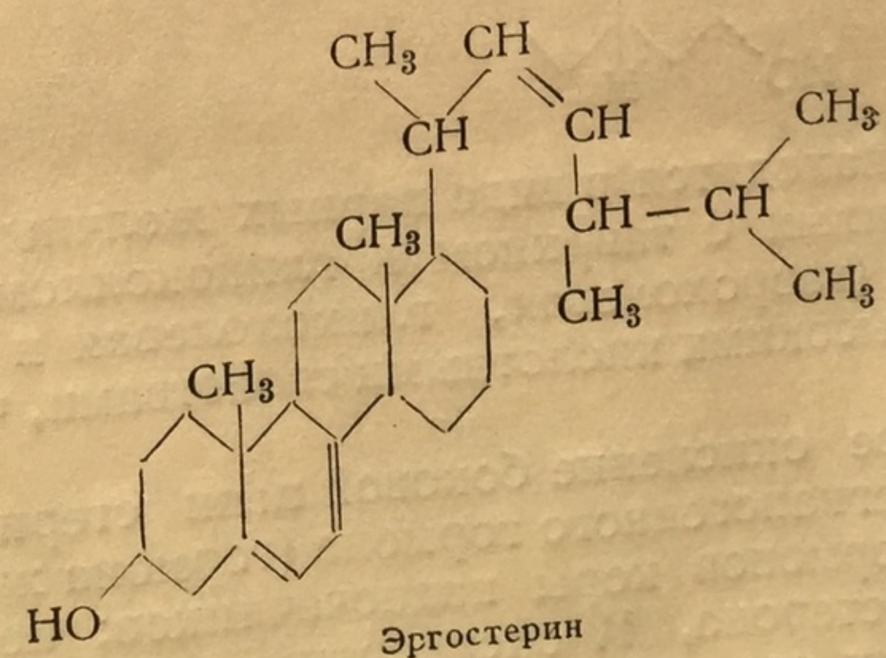
Группу стероидов образуют многочисленные биогенные соединения, являющиеся производными циклопентанопергидрофенантрена. Из них наиболее давно известны одноатомные вторичные алкоголи —стерины (стеролы) и их сложные эфиры с жирными кислотами (стериды). К стеринам относятся: холестерин, содержащийся во всех клетках и многих жидкостях животного организма, копростерин (стерин кала), эргостерин и ряд других.



Холестерин

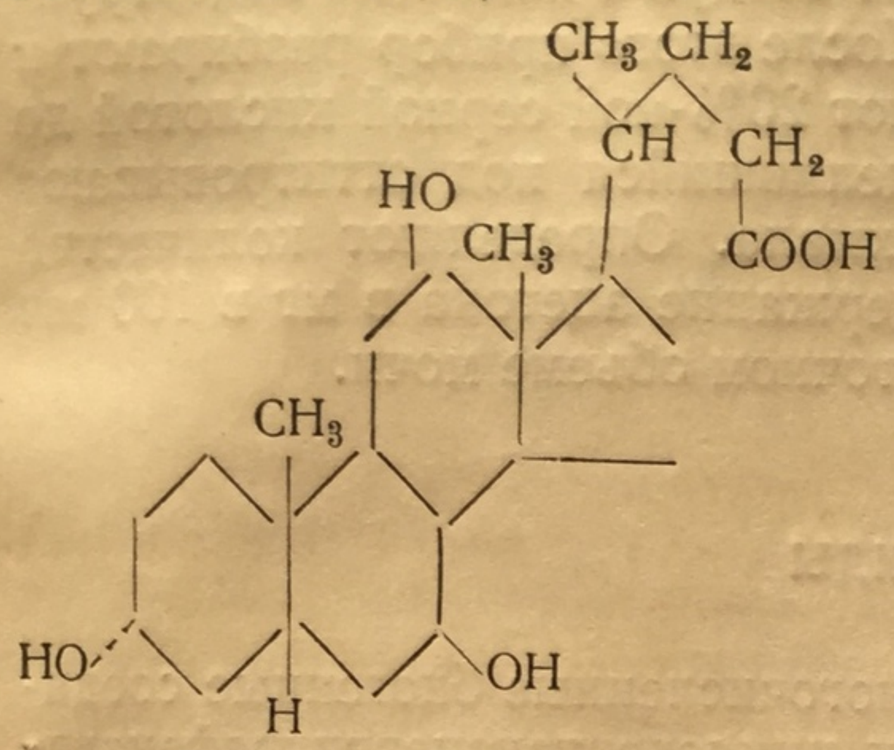


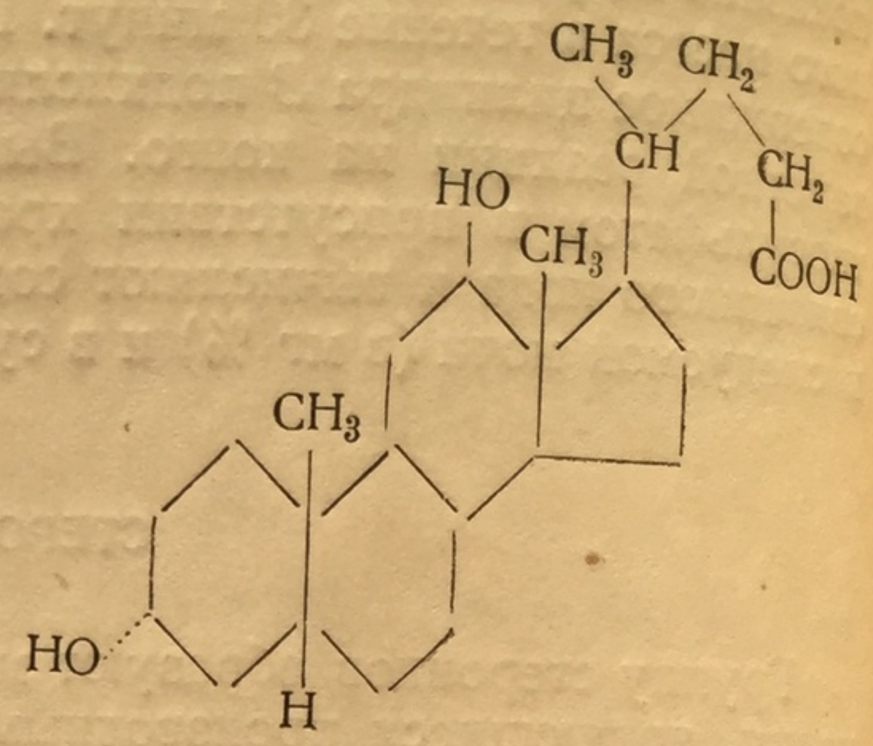
Копростерин

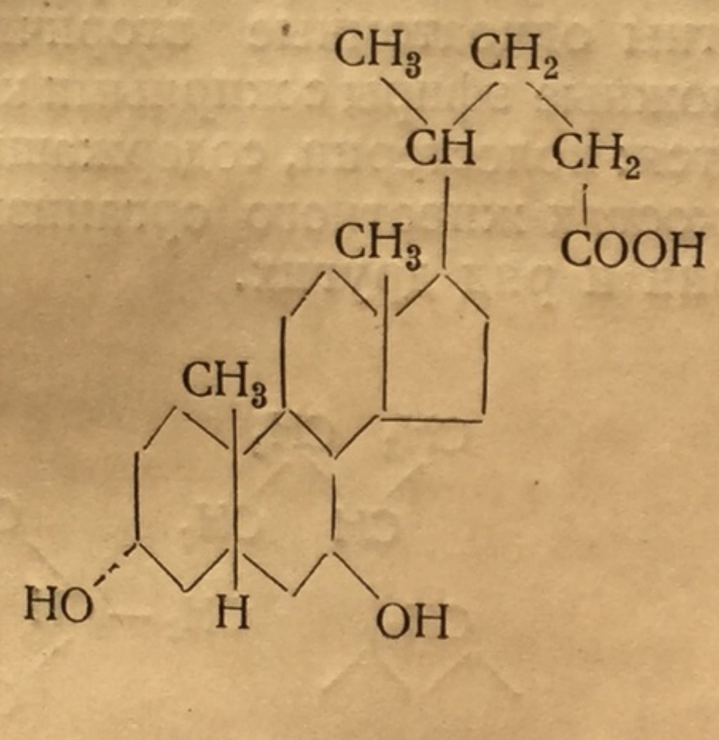


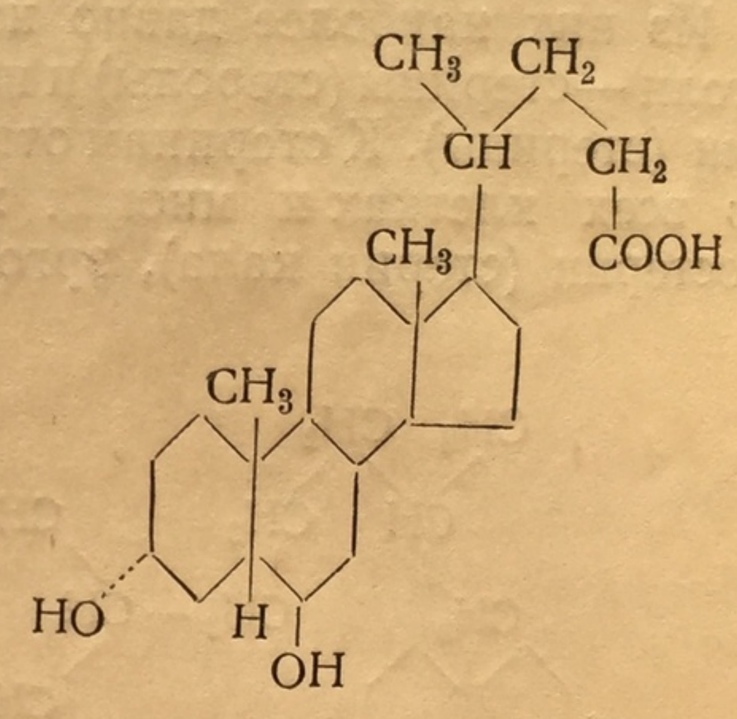
Эргостерин

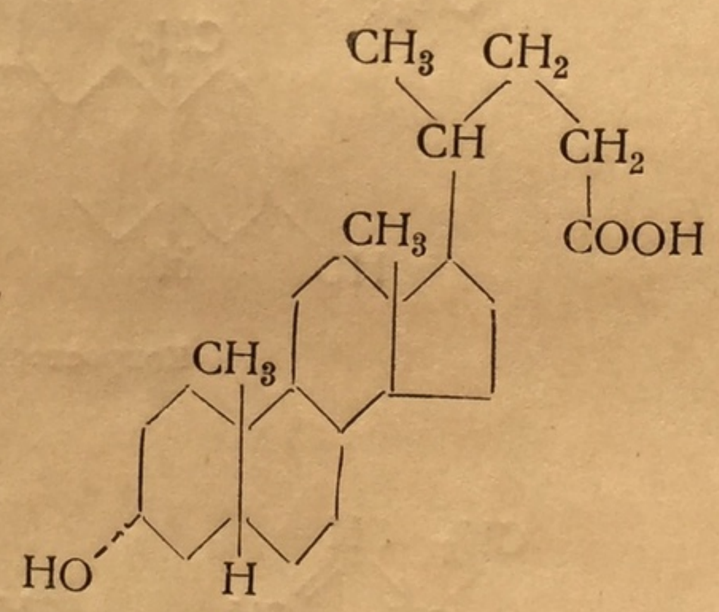
Продуктами частичного окисления копростерина являются желчные кислоты,







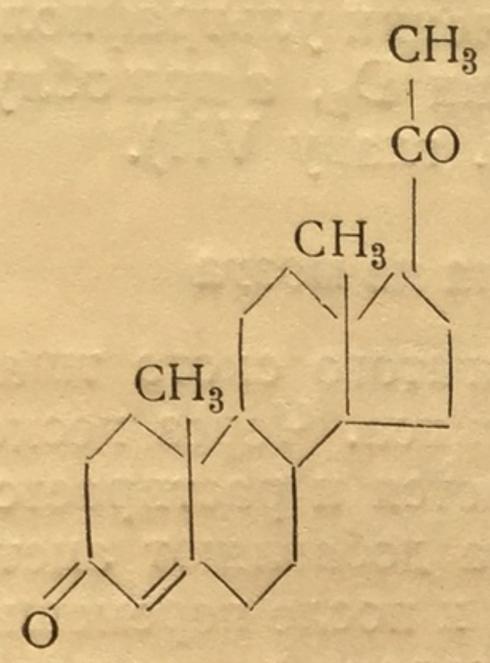




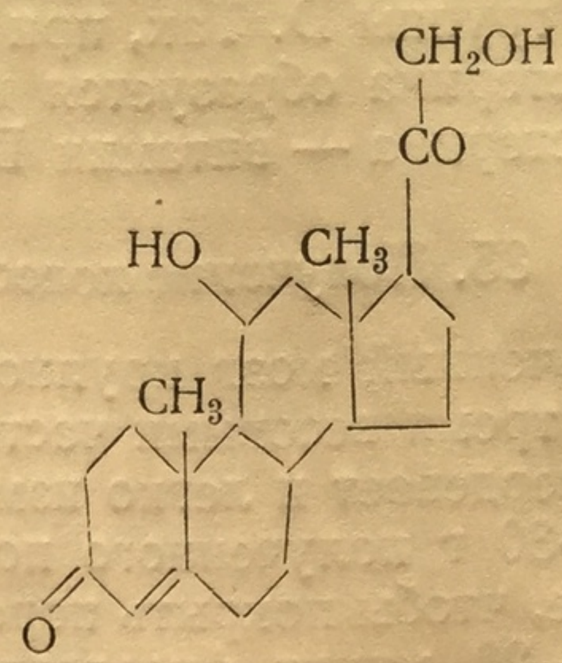
которые в желчи находятся в виде парных желчных кислот, т. е. амидов, образованных с таврином и гликоколлом. Эти парные желчные кислоты (таврохолевая, гликохолевая и др.) обладают несколько более высокими кислотными свойствами, чем сами желчные кислоты.

Более глубокое окисление боковой цепи стеринов приводит к образованию прегнаногенного гормона (гормона желтого тела)— прогестерона и гормонов коры надпочечников: кортикостерона, 11-дезоксикортикостерона, 17-оксикортикостерона и ряда других, регулирующих солевой и водный обмен и обмен углеводов

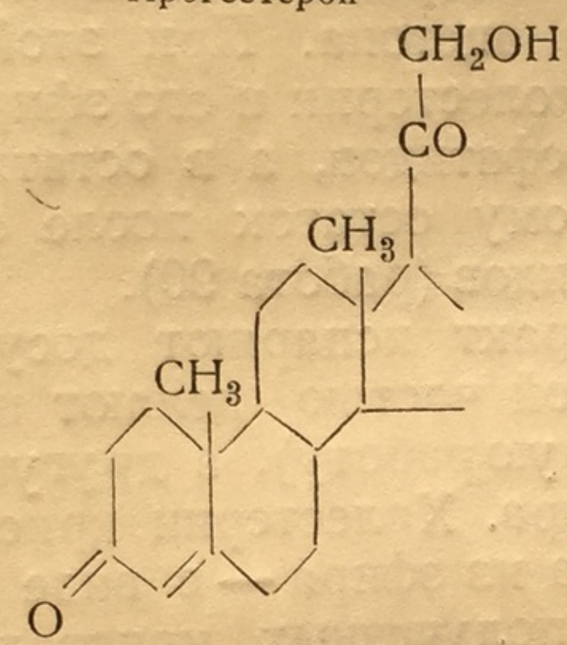
в организме:



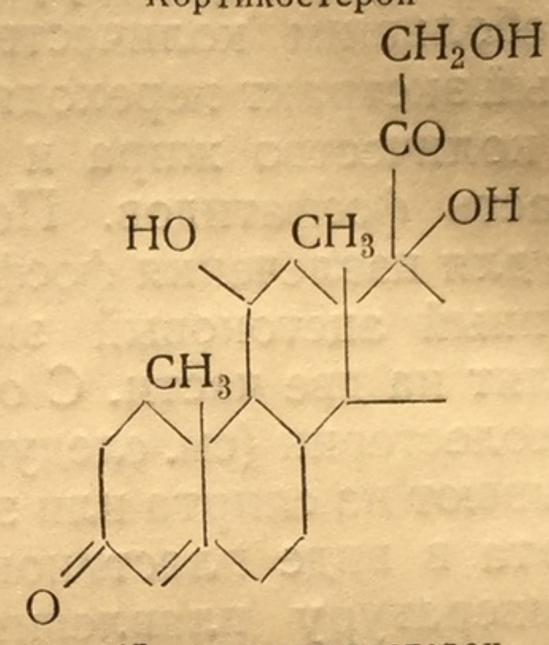
Прогестерон



Кортикостерон

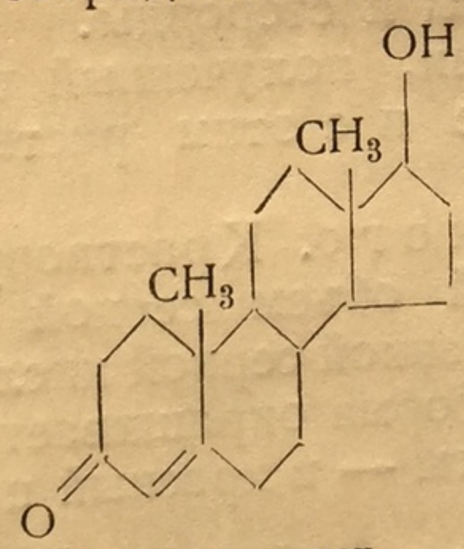


11-дезоксикортикостерон

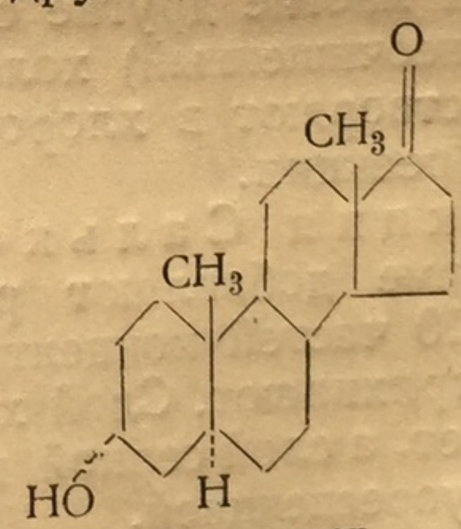


17-оксикортикостерон

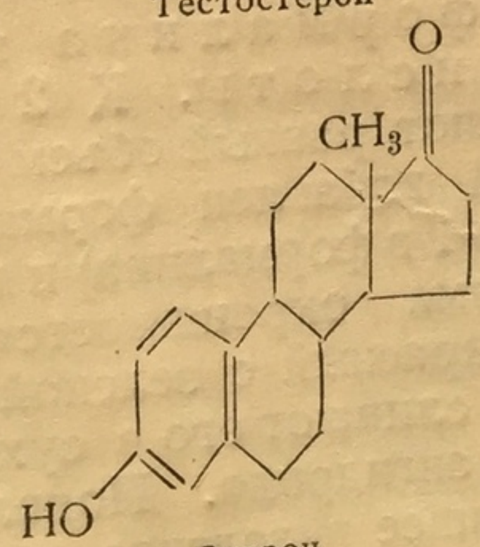
При полном окислительном отщеплении боковой цепи стеринов образуются андрогенные и эстрогенные гормоны. Сюда относятся гормон тестикул — тестостерон, андростерон — андрогенный гормон мочи, эстрон, эстрадиол и некоторые другие эстрогенные гормоны:



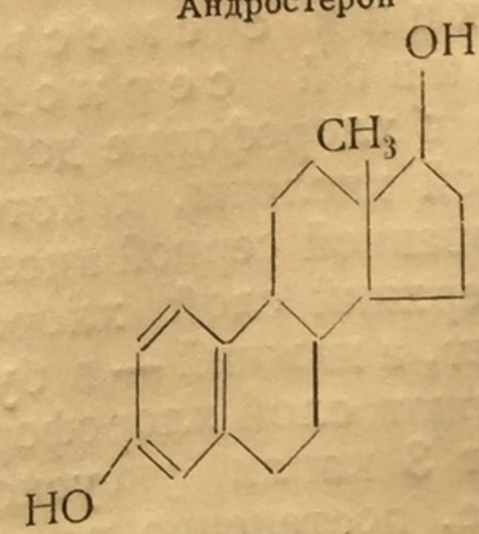
Тестостерон



Андростерон



Эстрон



Эстрадиол

Кроме того, существует связь между стеринами и образованием витаминов группы D. Так, при облучении ультрафиолетовыми лучами эргостерина образуется витамин D_2, а при облучении 7-дегидрохолестерина — витамин D_3 (см. главу VII).

Работа 85. **Получение холестерина из мозга**

Измельченный мозг крупного рогатого скота тщательно смешивают с тремя весовыми частями гипса. Через несколько часов масса затвердевает и легко измельчается и растирается в ступке.

К 20—30 г полученного порошка добавляют ацетон в таком количестве, чтобы покрыть порошок, и после перемешивания в течение 15—20 минут фильтруют экстракт, промывая остаток на фильтре небольшим количеством ацетона. При этой операции в ацетоновый экстракт переходят холестерин и его эфиры и незначительное количество жира и фосфатидов, а в остатке остается главная часть фосфатидов. Поэтому остаток после экстракции сохраняют для извлечения фосфатидов (работа 90).

Полученный ацетоновый экстракт испаряют досуха. Сухой остаток делят на две части. С одной частью делают цветные реакции на холестерин (см. следующую работу), а другую перекристаллизовывают из спирта или эфира. Холестерин кристаллизуется из спирта в виде пластинок, а из эфира — в виде игл. Определяют температуру плавления полученных кристаллов (темп. плавления холестерина 147°).

Работа 86. **Цветные реакции на холестерин**

Следующие цветные реакции дают не только холестерин и его эфиры, но и многие другие стерины и стероиды.

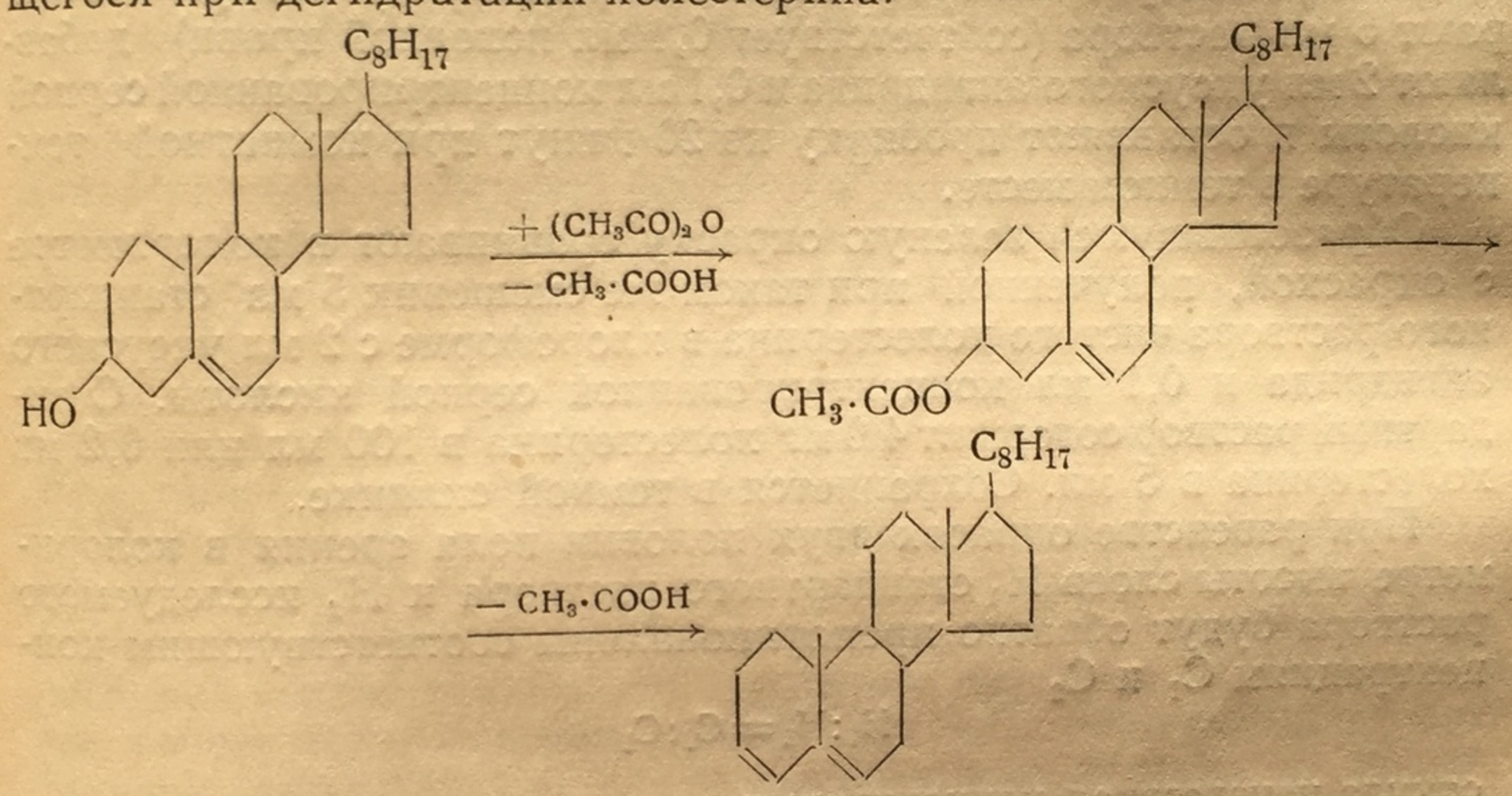
Сырой (неочищенный) холестерин, полученный в предыдущей работе, растворяют в хлорсформе и с этим раствором делают следующие реакции.

1. Реакция Сальковского. К раствору холестерина в хлорсформе добавляют равный объем серной кислоты уд. веса 1,76 (10 частей концентрированной серной кислоты и 1 часть воды) и встряхивают. Слой хлороформа окрашивается в кроваво-красный цвет, а слой серной кислоты — в красный цвет с сильной зеленой флуоресценцией.

2. Реакция с смесью формалина и концентрированной серной кислоты. К 2 мл раствора холестерина в хлороформе добавляют равный объем концентрированной серной кислоты, к которой добавлен формалин (на 50 г концентрированной серной кислоты 1 г формалина) и встряхивают. При этом верхний слой хлорсформа окрашивается в вишнево-красный цвет, а нижний — в буро-красный с зеленой флуоресценцией. Отделяют слой хлороформа, сливают его в сухую пробирку и добавляют 3 капли уксусного ангидрида. Появляется синее окрашивание, постепенно переходящее в зеленое.

3. Реакция с уксусным ангидридом и концентрированной серной кислотой. К 2 мл раствора холестерина в хлороформе добавляют 5—10 капель уксусного ангидрида и затем несколько капель концентрированной серной кислоты. Смесь окрашивается в быстро исчезающий красный цвет, затем — в синий и, наконец, в более стойкий зеленый цвет. При незначительном содержании холестерина в растворе, сразу образуется зеленое окрашивание.

Эта цветная реакция, служащая и для количественного определения холестерина (см. работу 88), основана на образовании окрашенной в зеленый цвет сульфокислоты холестерилена, образующегося при дегидратации холестерина:



Работа 87. **Открытие холестерина в составе желчи**

Холестерин, находящийся практически во всех клетках и тканях животного организма, является постоянной составной частью желчи.

Для открытия холестерина 20 мл желчи выпаривают досуха на водяной бане. Сухой остаток хорошо перемешивают стеклянной палочкой с 5—10 мл эфира и эфирный экстракт отфильтровывают. Эфир отгоняют, остаток растворяют в хлороформе и с полученным раствором делают цветные реакции на холестерин (см. предыдущую работу).

Работа 88. **Определение холестерина в крови или сыворотке**

В основе метода лежит цветная реакция, которую дает холестерин при добавлении к его раствору в хлороформе уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты (см. работу 86). Зеленая окраска, образующаяся при этом, не является постоянной; она достигает максимума через 20 минут после смешения реактивов и через 60 минут начинает ослабевать и в дальнейшем почти совершенно исчезает.

В длинную пробирку с притертой пробкой отмеривают 1,5 мл воды и затем 0,2 мл крови или сыворотки. Добавляют небольшой кусочек твердого едкого натрия ($\approx$0,4 г), слегка нагревают для растворения щелочи и затем ставят пробирку на 2 часа в кипящую водяную баню. По охлаждении жидкости к ней добавляют 10 мл хлороформа и хорошо встряхивают пробирку, охлаждая ее водой.

В пробирку добавляют 3 г белой глины и встряхивают содержимое пробирки, причем порошок глины, связывая воду, сбивается в комок. Вместо белой глины можно применить для связывания воды добавление 0,3 г двуводного вторичного фосфата натрия, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, который получается выветриванием на воздухе $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$. Хлороформенный раствор фильтруют, отбирают 5 мл раствора (соответствует 0,1 мл исходной крови), добавляют 2 мл уксусного ангидрида и 0,1 мл концентрированной серной кислоты и оставляют пробирку на 20 минут при комнатной температуре в темном месте.

Образовавшуюся зеленую окраску сравнивают в колориметре с окраской, полученной при таком же смешении 5 мл стандартного раствора чистого холестерина в хлороформе с 2 мл уксусного ангидрида и 0,1 мл концентрированной серной кислоты. Стандартный раствор содержит 4,0 мг холестерина в 100 мл или 0,2 мг холестерина в 5 мл. Сохраняется в темной склянке.

При равенстве окрасок двух половин поля зрения в колориметре высоты слоев H_1 стандартного раствора и H_2 исследуемого раствора будут обратно пропорциональны соответствующим концентрациям C_1 и C_2

$$H_1 : H_2 = C_2 : C_1$$

откуда неизвестная концентрация

$$C_2 = \frac{H_1 \times C_1}{H_2}$$

Отсюда содержание холестерина в исследуемой крови в мг % будет:

$$\text{мг \% холестерина} = \frac{H_1 \times 0{,}2 \times 1000}{H_2}$$

Содержание холестерина в крови в норме колеблется в пределах 140—180 мг%; при беременности возрастает до 300 мг % и выше. Холестерин в крови находится в виде свободного холестерина (главным образом в эритроцитах) и в виде эфиров холестерина с жирными кислотами.

Работа 89. **Свойства и реакции желчных кислот**

Желчные кислоты — поверхностноактивные вещества, понижающие поверхностное натяжение раствора. По этой причине желчь обладает более низким поверхностным натяжением, чем вода, что играет существенную роль при образовании стойких

эмульсий жиров в физиологических условиях, при действии желчи в тонких кишках на пищевую массу.

В две пробирки наливают по 5 мл дестиллированной воды и затем в одну из них прибавляют 3—5 капель желчи или раствора желчных кислот. После этого на поверхность жидкости в пробирках насыпают по небольшому количеству серного цвета. В пробирке с чистой водой сера плавает на поверхности, а в пробирке с разбавленной желчью — тонет.

Для получения холевой кислоты к 1 000 мл желчи крупного рогатого скота добавляют 20 мл 80%-ой уксусной кислоты и выпавший осадок белков отделяют центрифугированием. К прозрачному центрифугату добавляют 100 г едкого калия и после растворения жидкость нагревают при кипении с обратным холодильником около 10—15 часов. К темноокрашенной жидкости по охлаждении добавляют соляной или серной кислоты до кислой реакции. При этом выделяется смолистый коричневый осадок желчных кислот, который постепенно затвердевает в кристаллическую массу. Кристаллы отделяют фильтрованием, промывают водой и перекристаллизовывают из водного этилового спирта. После первой кристаллизации получаются почти белые кристаллы с температурой плавления 180°. После трех кристаллизаций белые кристаллы с температурой плавления 195—196°.

Для открытия желчных кислот может служить реакция, основанная на том, что желчные кислоты дают окрашенные соединения с оксиметилфурфуролом, образующимся при действии концентрированной серной кислоты на растворы сахарозы или фруктозы (см. работу 44). Холестерин не дает так легко этой реакции и поэтому она может быть применена для обнаружения желчных кислот.

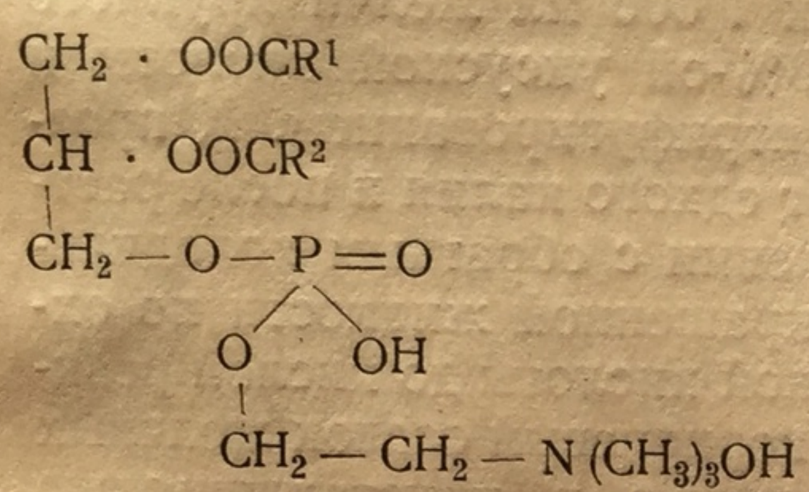
К 3—4 мл разведенной в пять раз желчи или к раствору желчных кислот прибавляют в пробирке 5—10 капель 5%-ного раствора сахарозы. Встряхивают жидкость и затем осторожно наливают 2 мл концентрированной серной кислоты. На границе слоев появляется осадок желчных кислот и образуется красно-фиолетовое кольцо. Смешивают содержимое пробирки при хорошем охлаждении. Жидкость приобретает вишнево-красную окраску. При проведении этой реакции следует избегать разогревания жидкости, так как при повышении температуры окраска появляется и в отсутствии желчных кислот.

ФОСФАТИДЫ (ФОСФОЛИПИДЫ)

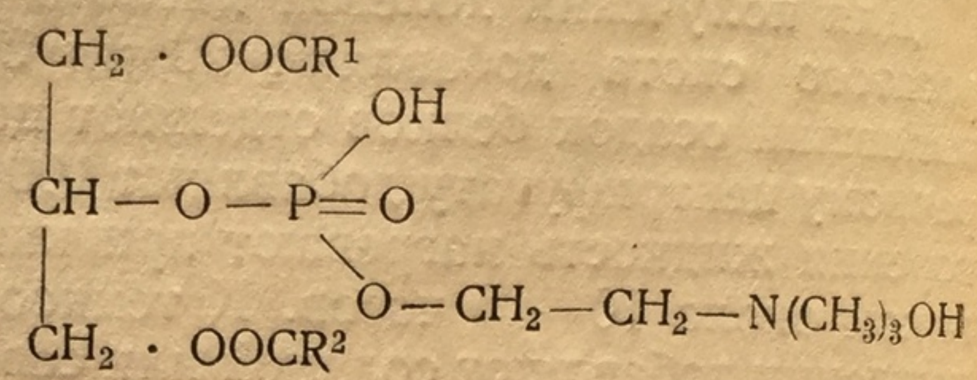
К фосфатидам относятся липоиды, отличающиеся тем, что в их молекуле содержится эфирносвязанный остаток фосфорной кислоты. Фосфатиды нерастворимы в воде, но набухают в ней, образуя эмульсии или коллоидные растворы. Большинство фосфатидов нерастворимо в ацетоне. Фосфатиды образуют непрочные соединения с белками и другими соединениями клетки, причем эти соединения легче растворимы в воде, чем сами фосфатиды. Фосфа-

тиды легче гидролизуются, чем простые триглицериды. Фосфатиды довольно многочисленны и разнообразны по своему строению.

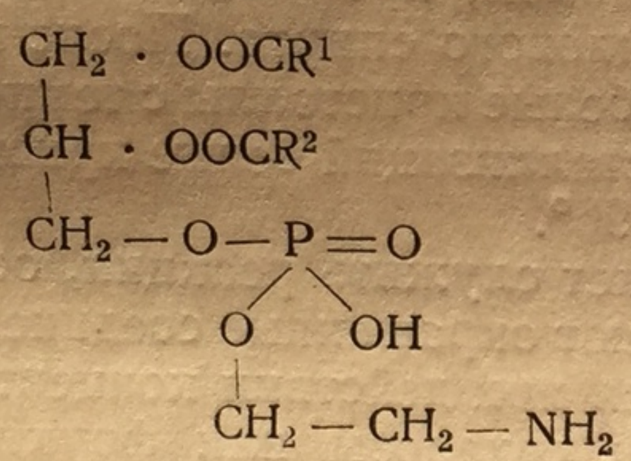
Наиболее изученными фосфатидами являются лецитины и кефалины. Первые при гидролизе, наряду с глицерином, фосфорной кислотой и жирными кислотами, дают холин, а вторые — коламин (этаноламин). В зависимости от положения остатка фосфорной кислоты возможны изомерные структуры α- и β-лецитинов и кефалинов.



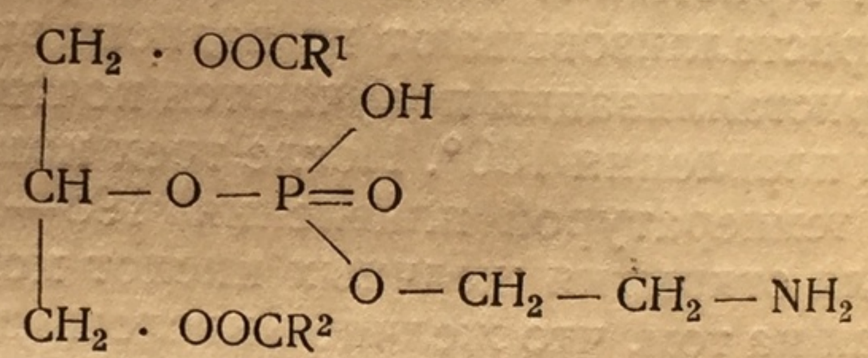
α-лецитины



β-лецитины



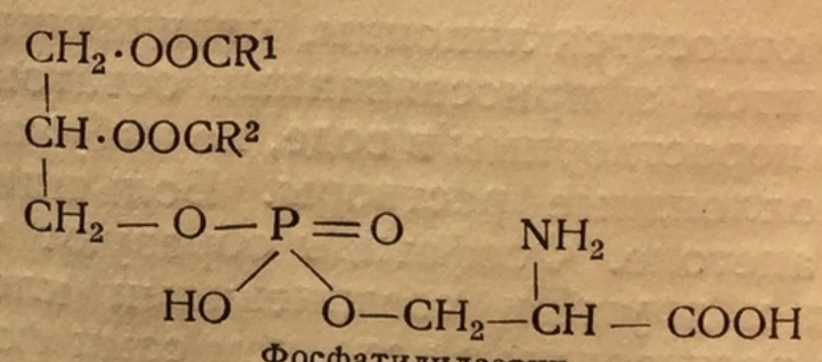
α-кефалины



β-кефалины

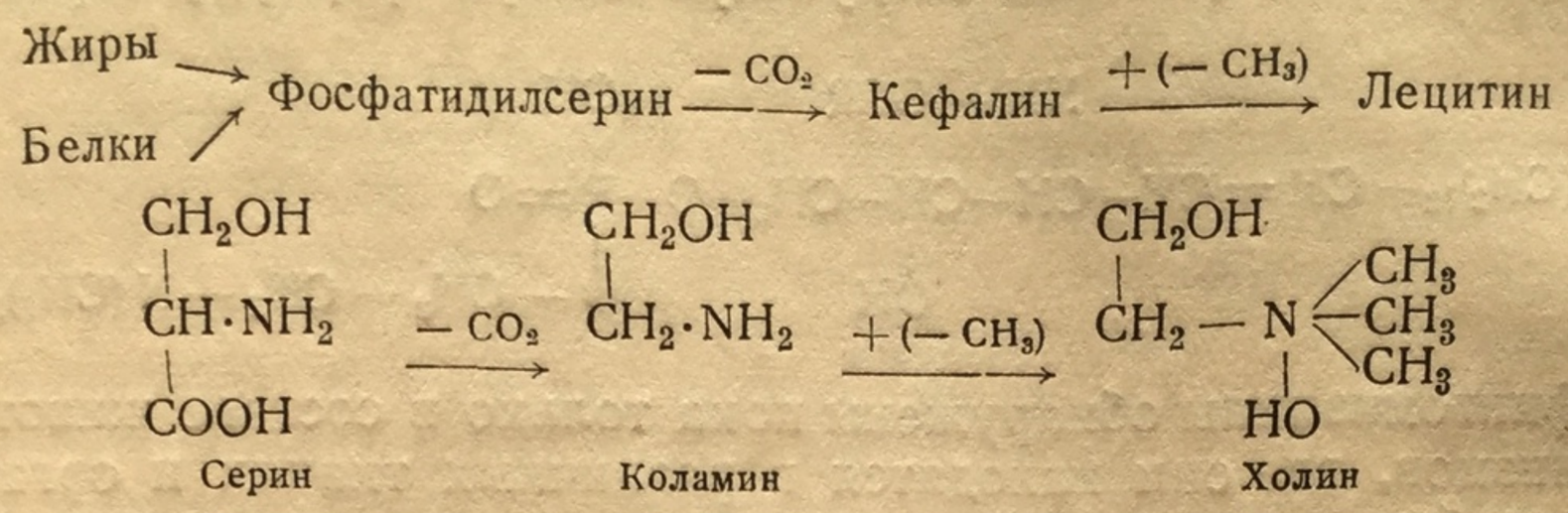
В состав отдельных лецитинов входят пальмитиновая, стеариновая, линолевая, линоленовая и арахидоновая кислоты, а в состав кефалинов — стеариновая, бегеновая, линолевая, олеиновая и арахидоновая кислоты. Лецитины и кефалины, выделяемые из тканей, представляют собою, также как и естественные жиры, смесь нескольких индивидуальных веществ. Природные лецитины и кефалины оптически активны.

Лецитины и кефалины широко распространены в растительных и животных организмах. Присутствие их, особенно кефалинов, характерно для нервной ткани. В ткани головного мозга, наряду с лецитинами и кефалинами, находятся близкие к ним соединения, в молекуле которых вместо холина или коламина содержится остаток аминокислоты серина:

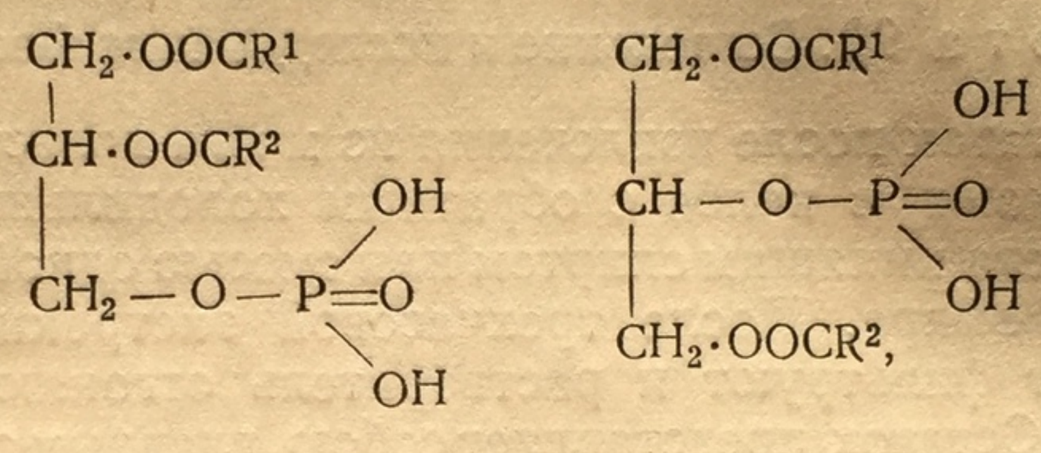


Фосфатидилсерин

Все эти фосфатиды находятся между собою, а через фосфатидилсерин с белками и жирами, в генетической связи:

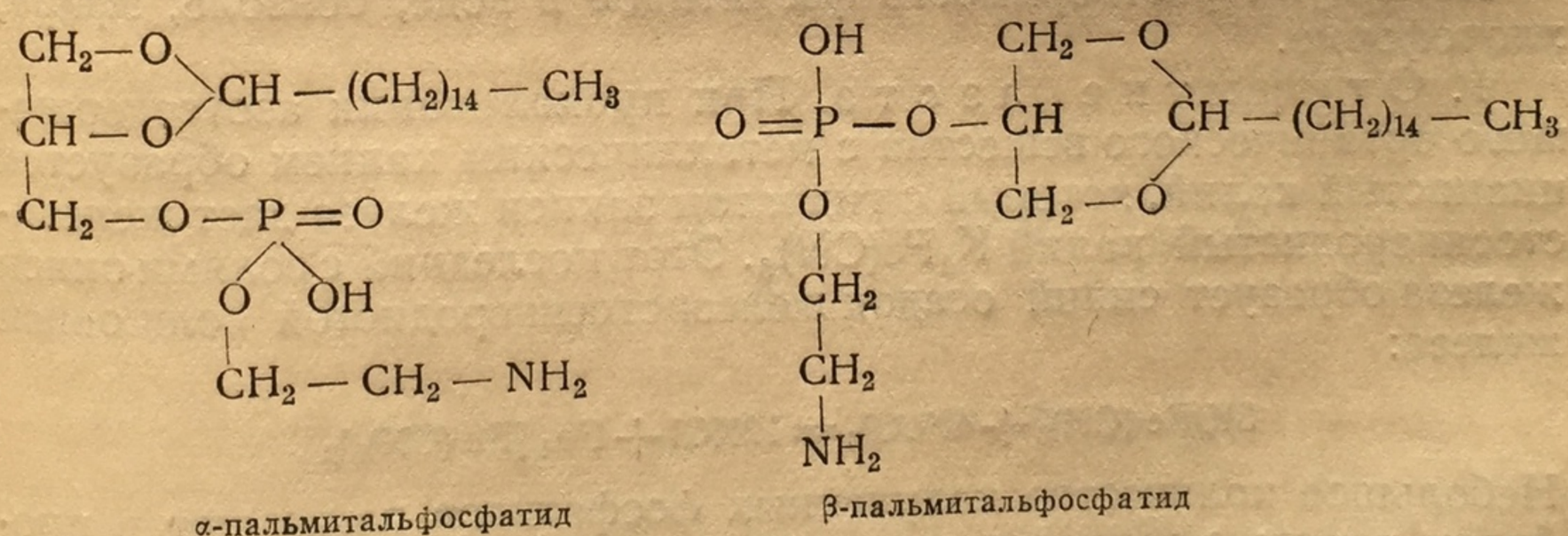


Другой группой веществ, связывающих фосфатиды с жирами, являются фосфатидные кислоты:



представляющие собой промежуточные продукты метаболизма триглицеридов и синтеза фосфатидов.

В тканях животного организма широко распространены фосфатиды, близкие к кефалинам, но содержащие вместо остатков жирных кислот, остаток пальмиталя или стеараля. Эти соединения, построенные по типу полных ацеталей, носят название ацетальфосфатидов:

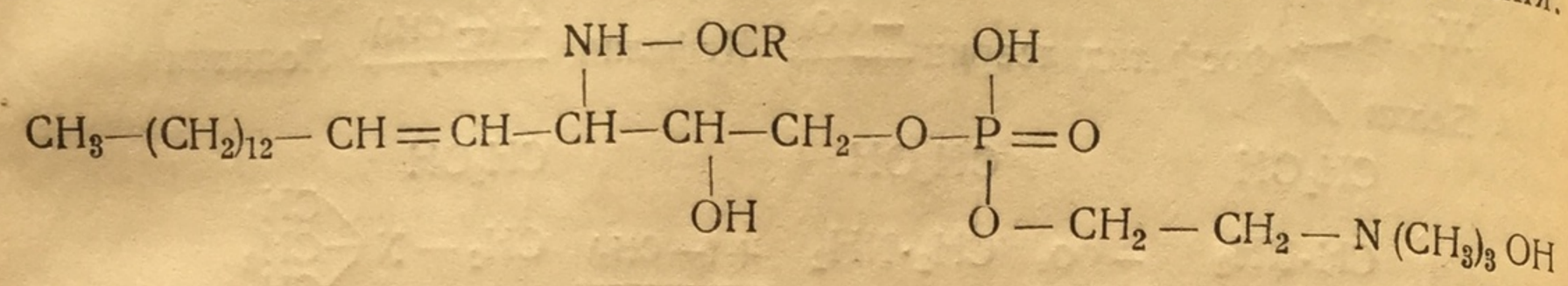


α-пальмитальфосфатид β-пальмитальфосфатид

Смесь таких ацетальфосфатидов — плазмалоген отделяется от других фосфатидов ткани за счет своей нерастворимости в серном и петролейном эфире.

Особую группу фосфатидов представляют сфингомиэлины, отличающиеся от всех перечисленных фосфатидов тем, что не принадлежат к глицеридам и вместо глицерина содержат аминогликоль сфингозин. При гидролизе сфингомиэлинов кроме сфингозина получаются холин, фосфорная кислота и жирные кислоты—

стеариновая, лигноцериновая и нервоновая. Для сфингомиэлинов можно считать вероятной следующую общую формулу строения:



Сфингомиэлины обнаружены пока только в составе животных организмов, где они находятся в различных тканях и органах, но в особенно значительном количестве они находятся в нервной ткани.

Работа 90. **Выделение и исследование фосфатидов**

Остаток после извлечения из мозга холестерина (см. работу 85) извлекают в колбе с обратным холодильником или в аппарате Сокслета кипящим спиртом или смесью одной части спирта и одной части эфира. После трехчасовой экстракции охлажденный экстракт фильтруют и растворитель отгоняют досуха на водяной бане. Остаток представляет собою, главным образом, смесь лецитинов и кефалинов.

Небольшую часть полученного сухого остатка растворяют в спирте. Спиртовый раствор делят на три части. К одной добавляют воды, причем образуется белая опалесцирующая эмульсия, к другой — несколько капель насыщенного спиртового раствора хлористого кадмия, при этом выпадает белый осадок нерастворимого кадмиевого соединения лецитинов, и к третьей — ацетон.

Исследуют растворимость фосдатидов в воде, бензоле, эфире, хлороформе.

1. Открытие азота. При прокаливании азотсодержащего органического вещества с металлическим калием образуется цианистый калий, который с гидратом закиси железа дает железистосинеродистый калий $K_4Fe(CN)_6$. Этот последний с солями окиси железа образует синий осадок железистосинеродистой соли окиси железа:

$$3K_4Fe(CN)_6 + 4FeCl_3 = 12KCl + Fe_4[Fe(CN)_6]_3$$

Небольшое количество полученных фосфатидов помещают в пробирку вместе с зернышком металлического калия и прокаливают до полного разложения. Раскаленную пробирку опускают осторожно под тягой в стаканчик с 5 мл дестиллированной воды, причем пробирка лопается. Раствор отфильтровывают от угля и кусочков стекла, прибавляют немного раствора железного купороса и кипятят одну-две минуты. По охлаждении прибавляют 2—3 капли раствора хлорного железа и подкисляют разбавленной соляной кислотой. При этом выпадает синий осадок железистосинеродистой соли окиси железа или, если азота было мало, жид-

кость приобретает зеленовато-синюю окраску и осадок выделяется лишь после стояния.

2. Продукты гидролиза фосфатидов. Оставшуюся часть фосфатидов помещают в большую пробирку, добавляют тройной объем 10%-ного раствора едкого натра и нагревают при кипении 15—20 минут. При этом происходит гидролиз фосфатидов. Так как холин, отщепляющийся от лецитинов, подвергается, кроме того, дальнейшему расщеплению с образованием триметиламина, то во время нагревания ощущается характерный для триметиламина запах селедочного рассола.

Полученный после гидролиза щелочной раствор разбавляют небольшим количеством воды и подкисляют 10%-ной соляной кислотой, причем выделяются жирные кислоты. Жирные кислоты отделяются фильтрованием. Фильтрат нейтрализуют и выпаривают на водяной бане досуха. Часть сухого остатка сплавляют в пробирке с кислым сернокислым калием, причем образуется акролеин (проба на глицерин; работа 70).

Другую часть сухого остатка сплавляют в тигле с смесью из двух частей соды и одной части азотнокислого калия и осторожно прокаливают сплав до полного окисления. Остаток растворяют в разбавленной азотной кислоте и добавляют к полученному раствору большой избыток раствора молибденовокислого аммония. После непродолжительного нагревания выделяется желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония (открытие фосфорной кислоты; работа 3).

ГЛАВА VI

БЕЛКИ (ПРОТЕИНЫ)

> «Жизнь — это способ существования белковых тел, существенным моментом которого является постоянный обмен веществ с окружающей их внешней природой, причем с прекращением этого обмена веществ прекращается и жизнь, что приводит к разложению белка».
>
> *Ф. Энгельс* («Диалектика природы» стр. 246, ОГИЗ, 1948).

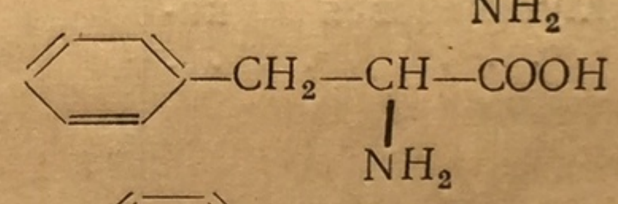
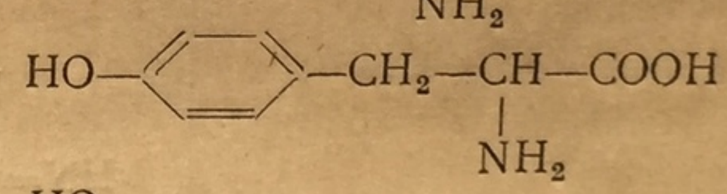
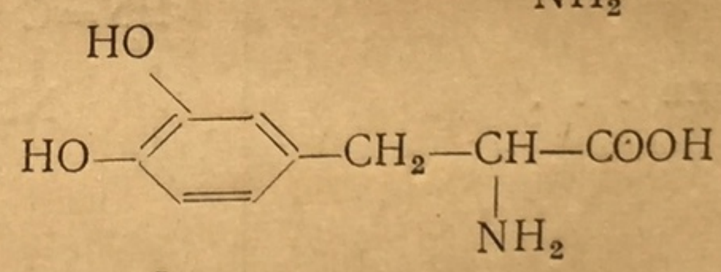
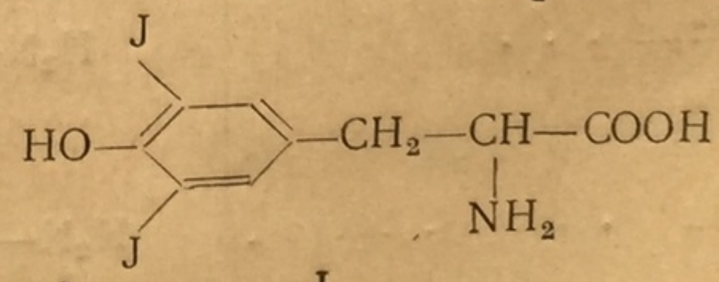
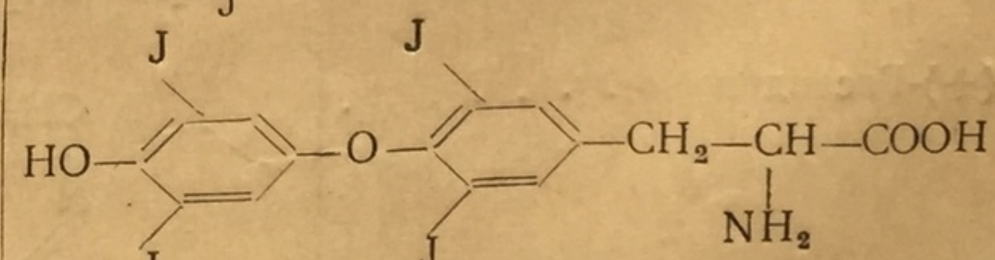
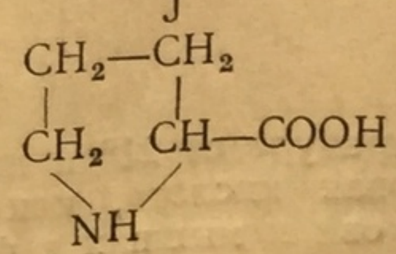
Белки являются наиболее важной и существенной составной частью протоплазмы. Существование живой клетки, не содержащей белковых веществ, невозможно. Сложная совокупность явлений, которая характерна для живого организма, имеет в своей основе непрерывные процессы ассимиляции и диссимиляции белка. Эта особая в построении протоплазмы роль белковых веществ подчеркивается названием протеины (πρωτος — первый, главный), часто употребляемым вместо названия — белки.

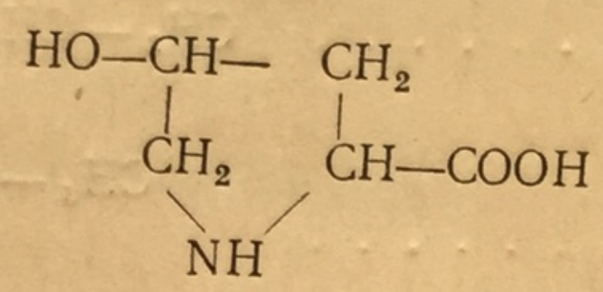
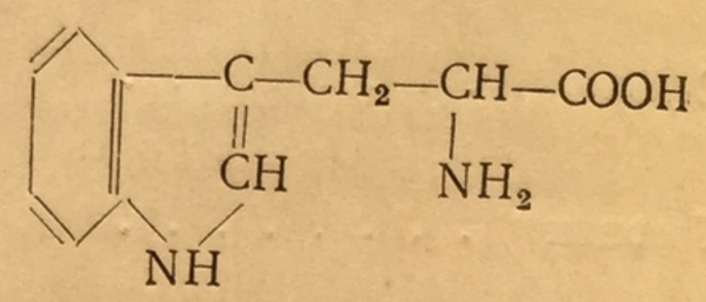
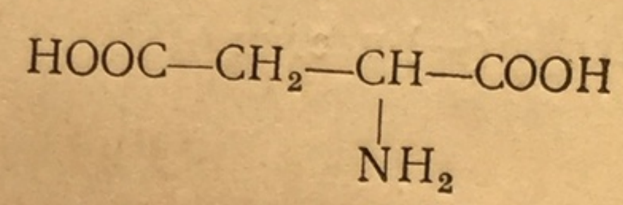
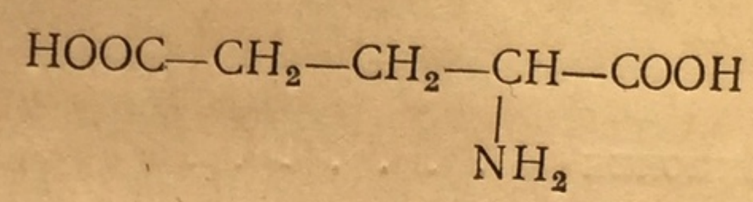
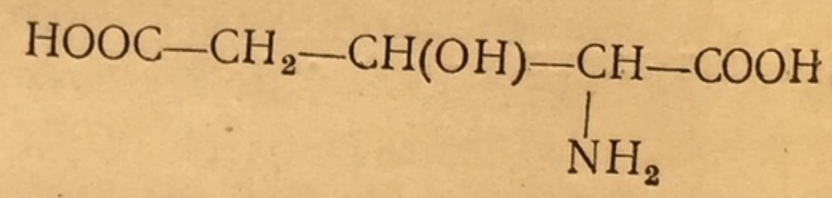
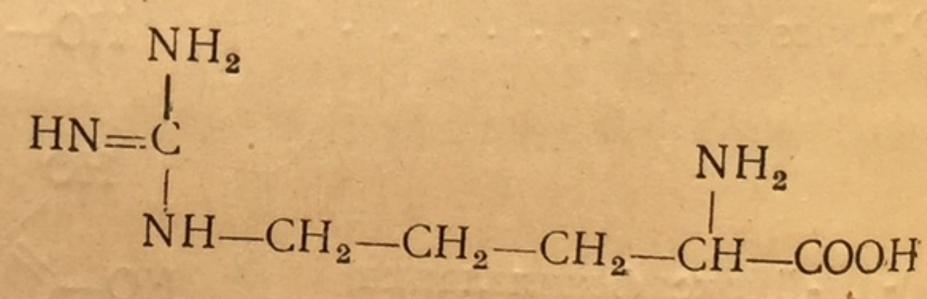
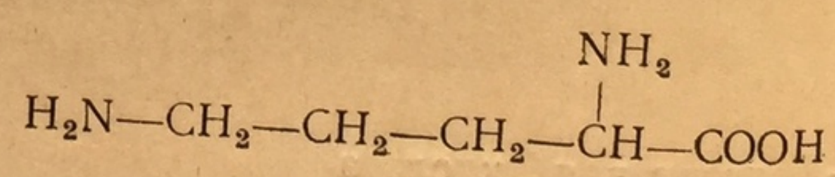
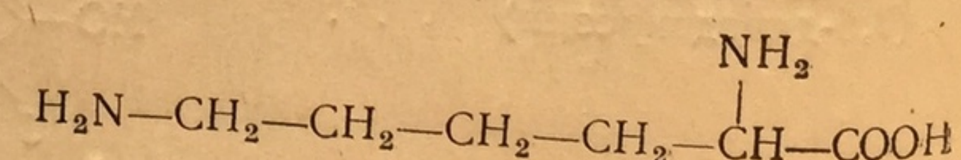
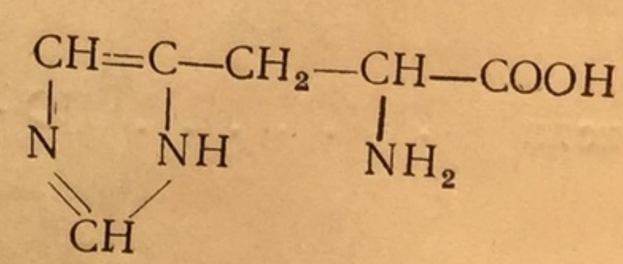
Белки представляют группу высокомолекулярных органических содержащих азот соединений, в химическом отношении отличающихся тем, что при гидролизе они распадаются, через ряд промежуточных продуктов, почти исключительно на аминокислоты. В настоящее время в составе различных белков обнаружены следующие аминокислоты:

Таблица 13

Перечень аминокислот, входящих в состав белков

Название	Формула
Гликоколл (глицин)	H_2N-CH_2-COOH
(+)-Аланин	$CH_3-CH(NH_2)-COOH$
(+)-Валин	$(CH_3)_2CH-CH(NH_2)-COOH$
(—)-Лейцин	$(CH_3)_2CH-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

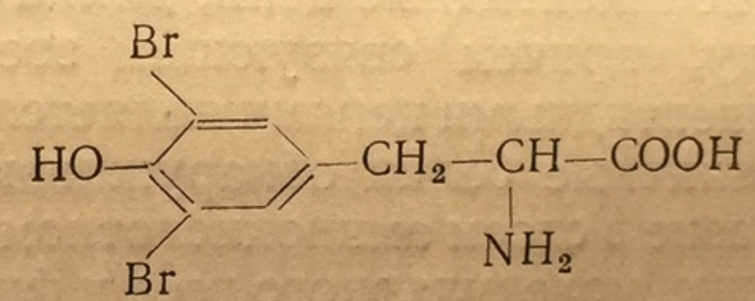
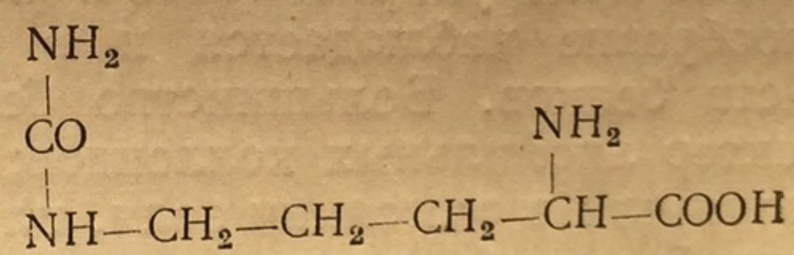
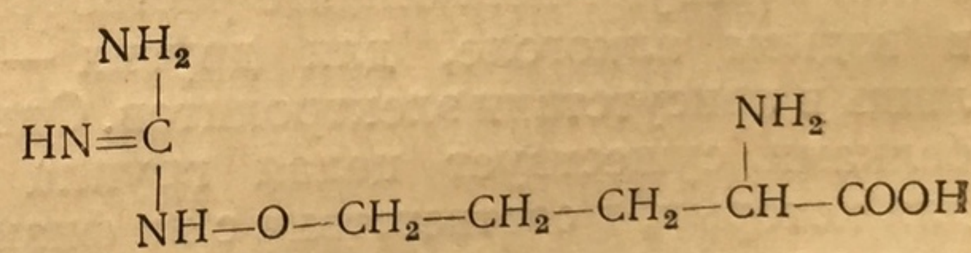
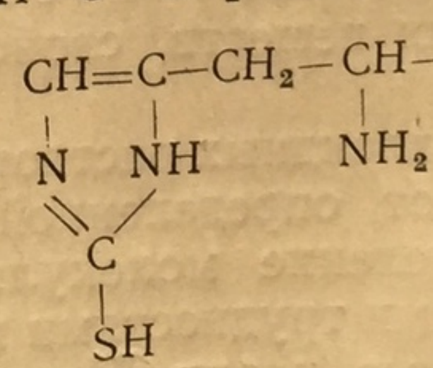
Название	Формула
(+)-Норлейцин	$CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
(+)-Изолейцин	$(CH_3-CH_2)(CH_3)CH-CH(NH_2)-COOH$
(—)-Серин	$HO-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
(+)-Треонин	$C_3-CH(OH)-CH(NH_2)-COOH$
(—)-Цистеин и (—)-цистин	$HS-CH_2-CH(NH_2)-COOH$ и $[-S-CH_2-CH(NH_2)-COOH]_2$
(—)-Метионин	$CH_3-S-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
(—)-Фенилаланин	
(—)-Тирозин	
(—)-3,4-Диоксифенилаланин	
(—)-Иодгорговая кислота (3,5-дииодтирозин)	
(—)-Тироксин	
(—)-Пролин	

Название	Формула
(—)-Оксипролин	
(—)-Триптофан	
(—)-Аспарагиновая кислота [1]	
(+)-Глутаминсвая кислота [2]	
(+)-β-Оксиглутаминсвая кислота	
(+)-Аргинин . . .	
(+)-Орнитин . . .	
(+)-Лизин	
(+)-Гистидин	

[1] При температуре от 21° и ниже вращает вправо.

[2] Глутаминовая кислота, как это установлено Д. Л. Фердманом, может находиться в крови и мышцах в форме своего моноамида — глутамина.

Кроме перечисленных в состав отдельных белков входят, повидимому, еще следующие аминокислоты:

Название	Формула
α-Аминомасляная кислота . .	$CH_3-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
Норвалин	$CH_3-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
β (?)-Оксивалин	$(CH_3)_2C(OH)-CH(NH_2)-COOH$
β (?)-Оксилизин	$H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH(OH)-CH(NH_2)-COOH$
Дьенкоповая кислота	$CH_2[-S-CH_2-CH(NH_2)-COOH]_2$
3,5-Дибромтирозин	
Цитруллин	
Канаванин	
Тиолгистидин	

Все аминокислоты, входящие в состав белков, принадлежат к ряду α-аминокислот. Все они, за исключением оптически недеятельного глицина, имеют асимметрическое строение. При этом, независимо от различного направления вращения в их растворах,

все белковые аминокислоты относятся по конфигурации α-C-атома к l-ряду, т. е. конфигурация их α-C-атома соответствует пространственной конфигурации l-молочной кислоты или пятого C-атома l-глюкозы. Такие аминокислоты как цистин, изолейцин, треонин и оксипролин имеют два асимметрических C-атома и могут существовать в виде четырех стереоизомерных форм, из которых только одна является природной. Энантиоморфные α-аминокислоты могут встречаться в составе белков лишь в виде следов, но они входят в состав некоторых полипептидов, продуктов обмена микроорганизмов, как, например, грамицидина и тироцидина. Таким образом, молекула белков, в состав которой входят l-α-аминокислоты, имеет асимметрическое строение.

Белки построены из остатков аминокислот, соединенных между собою пептидной связью. Этот главнейший и общий тип связи в молекуле белков не исключает и иных форм связи. Кроме полипептидной структуры в молекуле белков могут быть дикетопиперазиновые, оксазолиновые и тиазолиновые циклы, дисульфидные связи и другие.

Работами лауреатов Сталинской премии акад. Н. Д. Зелинского и Н. И. Гаврилова обоснована теория строения, согласно которой в белковой молекуле имеются как дикетопиперазиновые циклы, так и полипептидные цепи, длина которых в основном равна трипептиду, причем связующим звеном циклических группировок с полипептидными цепями является амидинная группа.

Различные белки обнаруживают довольно значительное разнообразие в своем аминокислотном составе, химических свойствах, величине молекулярного веса и физиологической роли. Такое же разнообразие наблюдается и в отношении физико-химических свойств белков. Большинство белков имеет ясно выраженный характер лиофильных коллоидов; в клетках и тканях белки находятся или в состоянии золя, или в состоянии геля. Некоторые белки образуют коллоидные растворы при растворении в воде или в водном алкоголе, для других — золеобразование возможно лишь в присутствии электролитов. Однако, наряду с растворимыми белками, существует целая группа белков — склеропротеинов, для которых, в соответствии с их физиологической ролью опорных или покровных веществ, свойственна практически полная нерастворимость.

В своих коллоидных растворах нативные белки монодисперсны, т. е. обладают определенной величиной молекулярного веса. Точное определение молекулярного веса белков сталкивается с значительными трудностями и поэтому величины молекулярного веса, находимые различными методами (осмотическое давление, диффузия, ультрацентрифугирование), часто не дают полного совпадения. Наиболее достоверные значения для молекулярного веса некоторых белков приведены в табл. 14.

Таблица 14

Молекулярный вес некоторых белков

Клупеин	4 450	Гемоглобин	69 000
Сальмин	5 600	Фибрин	69 300
Цитохром С	13 000—15 600	Серумальбумин	70 000
Гистон	17 000	Желатина	10 000—150 000
Лактальбумин	12 000—25 000	Миоген	150 000
Глиадин	27 000	Глобулин X	160 000
Папаин	27 000	Серумглобулин	165 000
Химотрипсиноген	30 000	Пероксидаза	35 000—175 000
Трипсин	34 000	Псевдоглобулин	142 000—177 000
Инсулин	35 500	Фиброин шелка	217 000
Пепсин	38 000	Каталаза	225 000—248 000
Трипсиноген	40 000	Желтый фермент	38 000—280 000
Лактоглобулин	42 000	Эдестин	310 000
Пепсиноген	42 000	Казеин	75 000—375 000
Овальбумин	44 500	Уреаза	483 000
Зеин	45 000	Фибриноген	500 000
Овомукоид	49 300	Тиреоглобулин	650 000
Миоглобин	16 900—68 000	Миозин	3 900 000
Кератин (шерсти)	68 000	Гемоцианины	387 000—9 660 000

РЕАКЦИИ ОСАЖДЕНИЯ

Переход из состояния золя в состояние геля, т. е. коагуляция (осаждение) белкового золя, может быть обратимым, если полученный гель способен снова перейти в золь, или необратимым, когда такой обратный переход невозможен. В последнем случае имеет место процесс денатурации белка и полученный осадок является денатурированным протеином. Белковые золи наименее стойки и наиболее легко коагулируют при изоэлектрическом состоянии белкового амфолита, т. е. при [H·], соответствующей изоэлектрическому пункту данного белка.

Кроме такого типа реакций осаждения, где коагуляция связана с тем или иным изменением коллоидального состояния или свойств самого протеина, белки дают реакции осаждения, основанные или на адсорбции их поверхностью некоторых коллоидальных осадков, или же на образовании нерастворимых соединений с некоторыми веществами.

Реакции осаждения имеют большое значение прежде всего для качественного открытия белковых веществ. Некоторые из них имеют также значение для количественного осаждения белков. Наконец, те реакции осаждения, которые представляют собой обратимое изменение состояния белков, служат для их выделения и разделения. Следует иметь в виду, что многие из реакций осаждения свойственны не только белкам. Так, например, алкалоид-

ными реактивами осаждаются альбумозы, пептоны и многие органические основания.

Для следующих реакций служит белок куриного яйца, разведенный физиологическим раствором.

Работа 91. Осаждение при нагревании кислотами и солями тяжелых металлов

Осаждение нагреванием. Раствор белка нагревают до кипения, причем происходит коагуляция. Параллельно нагревают раствор белка, подкисленный 1—2 каплями 1%-ной уксусной кислоты. При этом происходит более полное осаждение белка.

Нагревают до кипения сначала сильно подкисленный, а затем сильно подщелоченный раствор белка. Осаждения не наблюдается, так как в этих условиях образуются продукты неглубокого гидролиза белка: кислотный или щелочной альбуминаты.

Осаждение кислотами. При осторожном добавлении к раствору белка концентрированной азотной кислоты на границе жидкостей образуется белый хлопьевидный осадок. Эту же пробу повторяют с концентрированными серной и соляной кислотами.

Осаждение солями тяжелых металлов. К раствору белка прибавляют несколько капель 10%-ного раствора азотнокислого серебра. Происходит выделение осадка. К раствору белка добавляют осторожно, по каплям, разбавленный раствор сернокислой меди. Образуется осадок, растворяющийся в избытке осадителя.

Работа 92. Осаждение алкалоидными реактивами

Пикриновая кислота. Добавляют к раствору белка, подкисленного уксусной кислотой, несколько капель насыщенного раствора пикриновой кислоты. Образуется желтоватый осадок.

Таннин. При добавлении раствора таннина к подкисленному уксусной кислотой раствору белка выделяется сероватый осадок.

Железистосинеродистый калий. К подкисленному уксусной кислотой раствору белка добавляют по каплям 5%-ный раствор $K_4Fe(CN)_6$. Выделяется осадок.

Фосфорновольфрамовая и фосфорномолибденовая кислоты. Осаждают белок, добавляя к белковому раствору 10%-ный раствор фосфорновольфрамовой или фосфорномолибденовой кислоты.

Трихлоруксусная и сульфосалициловая кислоты. Белок осаждают, добавляя к белковому раствору несколько капель 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты или равный объем 20%-ного раствора сульфосалициловой кислоты.

Водный раствор 2%-ной лимонной кислоты и 1%-ной пикриновой кислоты (I) и насыщенный раствор иодной ртути в 5%-ном иодистом калии (II). Осаждают белок добавлением реактива (I) или добавлением к подкисленному соляной кислотой белковому раствору реактива (II).

Работа 93. **Осаждение гидратами окисей цинка и меди и каолином**

К раствору белка добавляют 5%-ный раствор сернокислой меди или сернокислого цинка и затем по каплям 5%-ный раствор едкого натра до полного осаждения. Отфильтровывают полученные осадки и исследуют фильтрат на отсутствие белка посредством одной из вышеописанных реакций.

Раствор белка подкисляют уксусной кислотой, добавляют половину объема каолина и встряхивают несколько минут. Отфильтровывают осадок и проверяют полноту осаждения нагреванием и реакциями с алкалоидными реактивами.

Работа 94. **Осаждение алкоголем и нейтральными солями щелочных и щелочноземельных металлов (высаливание)**

При смешении раствора белка с избытком алкоголя выделяется осадок. Осаждение это обратимо при условии, если оно ведется при достаточно низкой температуре (лучше всего около 0°) и не слишком длительном воздействии алкоголя.

К раствору яичного белка добавляют тонко измельченный твердый хлористый натрий до полного насыщения. При этом выпадает осадок глобулина. Его отфильтровывают и к фильтрату добавляют твердый измельченный сернокислый аммоний до полного насыщения. Выпадает осадок альбумина.

К раствору белка добавляют равный объем насыщенного раствора сернокислого аммония. При этом (полунасыщение) выпадает осадок глобулина. Его отфильтровывают и к фильтрату добавляют твердый измельченный сернокислый аммоний до полного насыщения. Выпадает осадок альбумина.

К раствору белка добавляют до полного насыщения твердый сернокислый магний. При этом выпадает глобулин. Его отфильтровывают и в фильтрате обнаруживают присутствие белка (альбумина) нагреванием и одной из проб с алкалоидными реактивами.

Для того, чтобы убедиться в обратимости осаждения солями, полученные осадки белков растворяют в воде (альбумины) или в 5—10%-ных растворах NaCl, $MgSO_4$ и других солей (глобулины).

ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ПУНКТ

Белковые вещества (протеины) способны к двоякого рода диссоциации — кислотной и основной, т. е. представляют собою амфолиты. Белковый амфолит может быть в состоянии, при

котором его молекулы электронейтральны вследствие того, что они находятся в виде амфионов

$$^{\oplus}H_3N - R - COO^{\ominus}$$

Такое состояние носит название изоэлектрического состояния, и для каждого белка, в зависимости от его химических свойств, наблюдается при определенной концентрации водородных ионов, которая поэтому называется изоэлектрическим пунктом данного белкового амфолита. При любой другой [H·] белок уже не будет электронейтральным. В средах с концентрацией водородных ионов большей, чем изоэлектрический пункт данного протеина, его молекулы находятся в состоянии белковых катионов

$$R\begin{matrix} NH_3^{\oplus} \\ COO^{\ominus} \end{matrix} + A^{\ominus} + H^{\oplus} = R\begin{matrix} NH_3^{\oplus} \\ COOH \end{matrix} + A^{\ominus}$$

и белок будет обладать ясно выраженным основным характером. Наоборот, в средах с концентрацией водородных ионов меньшей, чем изоэлектрический пункт данного белка, молекулы его находятся в состоянии белковых анионов

$$R\begin{matrix} NH_3^{\oplus} \\ COO^{\ominus} \end{matrix} + B^{\oplus} + OH^{\ominus} = R\begin{matrix} NH_2 \\ COO^{\ominus} \end{matrix} + B^{\oplus} + H_2O$$

и, следовательно, белок будет обладать кислым характером. Иными словами, состояние белковой молекулы может быть различным при различных [H·] среды относительно положения его изоэлектрического пункта. Таким образом, определение изоэлектрического пункта является необходимым для суждения о том, в каком из трех возможных состояний

$$R\begin{matrix} NH_3^{\oplus} \\ COOH \end{matrix} + A^{\ominus} \rightleftarrows {}^{\oplus}H_3N - R - COO^{\ominus} \rightleftarrows R\begin{matrix} NH_2 \\ COO^{\ominus} \end{matrix} + B^{\oplus} + H_2O$$

находится белок в среде с той или иной концентрацией водородных ионов.

Кроме белков, многие из веществ, входящих в состав живой клетки или находящихся в жидкостях организма в качестве продуктов обмена веществ, являются по своей природе амфолитами. Сюда относятся: аминокислоты, полипептиды, нуклеозиды, нуклеотиды, нуклеиновые кислоты и др. У всех этих веществ, так же как и у белков, наблюдается изоэлектрическое состояние и зависимость характера диссоциации от активной реакции среды.

Таблица 15

Изоэлектрический пункт (pH)

Фибриноген	5,4	Желатина	4,8
Серумальбумин	4,8	Гемоглобин	6,8
Серумглобулин α	5,05	Оксигемоглобин	6,65
Серумглобулин β	5,1	Гистон	8,0—10,0
Серумглобулин γ	6,0	Протамины	9,7—12,2
Миоген	6,5	Салмин	12,0
Миоальбумин	3,3	Тиреоглобулин	4,5
Миозин	5,5	Инсулин	5,35
Миоглобин	7,0	Цитохром С	10,65
Глобулин X	5,2	Папаин	9,0
Коллаген	7,7	Пепсин	2,75
Кератины	3,4—4,8	Нуклеиновая кислота	0,7
Эластин	6,9		

Работа 95. **Определение изоэлектрического пункта белков методом коагуляции**

Коллоидные растворы белковых амфолитов обладают в изоэлектрическом пункте минимальной стабильностью. Для некоторых белков эта минимальная устойчивость их коллоидных растворов сказывается в том, что они в изоэлектрическом пункте самопроизвольно коагулируют; другие белки в этом пункте наиболее легко коагулируют при добавлении какого-либо осадителя. Это свойство белковых растворов служит основанием для нижеследующего метода определения изоэлектрического пункта.

1. Определение изоэлектрического пункта желатины. Готовят семь пробирок и помещают в каждую по 5 мл буферных смесей (цитратно-фосфатных), как указано в следующей таблице:

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7
№ смеси	20	18	16	14	12	10	8
pH	6,8	5,6	5,2	4,8	4,4	4,0	3,6

В каждую пробирку помещают по 2 мл 1%-ного раствора желатины. В пробирку № 4 добавляют при встряхивании 90%-ный спирт до очень легкого помутнения раствора. Затем в остальные пробирки добавляют такое же количество алкоголя, как и в пробирку № 4. После 30-минутного стояния отмечают пробирку с максимальным помутнением и, таким образом, находят pH, отвечающий изоэлектрическому пункту желатины.

2. Определение изоэлектрического пункта мышечного глобулина. Готовят восемь пробирок

и наливают в каждую по 5 мл цитратно-фосфатных буферных смесей следующим образом:

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8
№ смеси	7	9	11	13	15	17	19	21
pH	3,4	3,8	4,2	4,6	5,0	5,4	5,8	6,2

В каждую пробирку добавляют по 1 мл солевого раствора мышечного глобулина. Отмечают пробирку, в которой после встряхивания получится максимальное помутнение; pH буферной смеси в этой пробирке соответствует изоэлектрическому пункту исследуемого протеина.

ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ

Для белков характерны некоторые цветные реакции. Часть этих реакций обусловлена присутствием тех или иных атомных группировок, общих для молекул различных белков, и поэтому такие реакции являются общими цветными реакциями на белки. К таким реакциям относятся биуретовая (реакция на полипептидную структуру) и нингидриновая (реакция на α-аминокислоты).

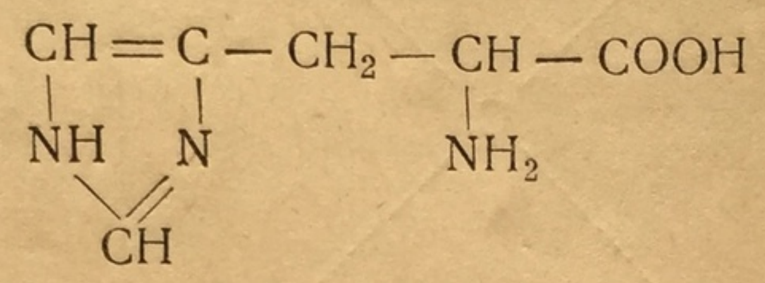
Другие реакции связаны с наличием в молекуле белка остатка той или иной аминокислоты и, следовательно, характерны только для белков, в молекулу которых входит данная аминокислота. Эти реакции ценны тем, что с их помощью легко составить общее представление о качественном аминокислотном составе исследуемого белка. Следует иметь в виду, что некоторые из цветных реакций на отдельные аминокислоты применимы только к свободным аминокислотам, т. е. лишь в растворах, получающихся после гидролиза белков (белковых гидролизатах). Кроме того, ни одна из цветных реакций в отдельности не является строго специфичной для белковых веществ. Поэтому для суждения о присутствии белка в том или ином изучаемом объекте необходима совокупность цветных реакций и реакций осаждения.

Для следующих задач служит белок куриного яйца, разведенный в пять-десять раз водой и отфильтрованный от выпавшего глобулина. Для отдельных реакций употребляют, кроме того, растворы казеина, желатины, пептона и белковые гидролизаты.

Работа 96. **Биуретовая реакция (реакция Пиотровского)**

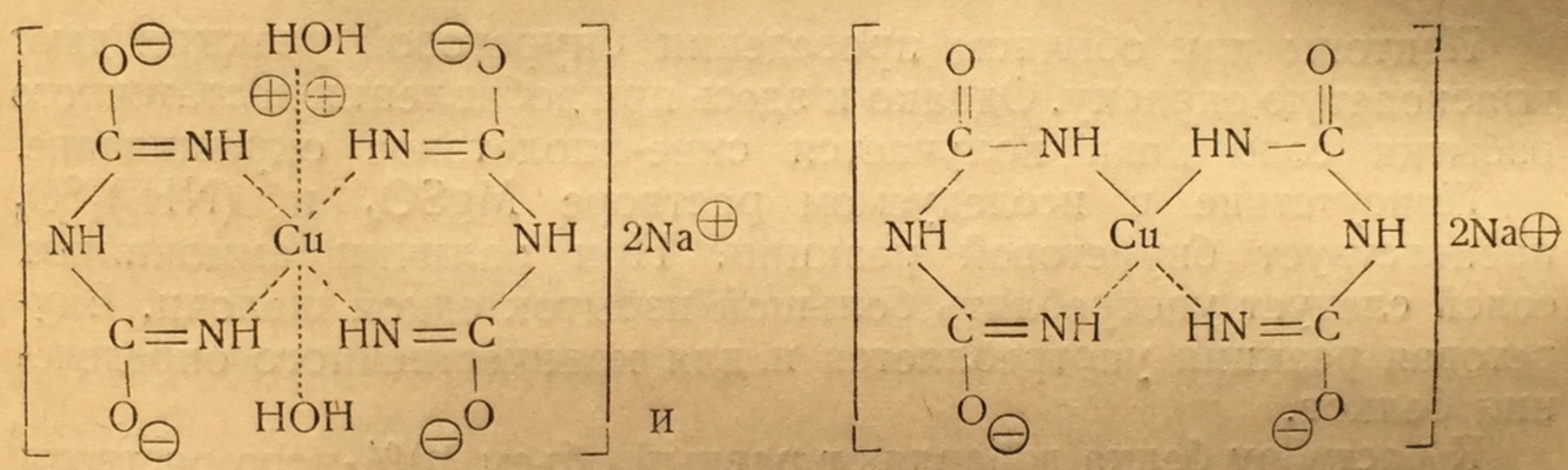
В сильно щелочном растворе, при добавлении соли меди, такие вещества, как биурет ($H_2N—CO—NH—CO—NH_2$), оксамид ($H_2N—CO—CO—NH_2$), полипептиды и белки образуют окрашенные в сине-фиолетовый и красновато-фиолетовый цвет комплексные соли. Биуретовая реакция, таким образом, обусловлена присут-

ствием в молекуле или двух —CO—NH—групп или—CO—NH— группы и групп—C(=NH)—NH_2 или — CH_2—NH—, связанных непосредственно между собою или через посредство атома углерода или азота. Поэтому биуретовую реакцию дают пептиды, содержащие, по крайней мере, три остатка аминокислот. Однако, некоторые соединения как, например, гистидин,

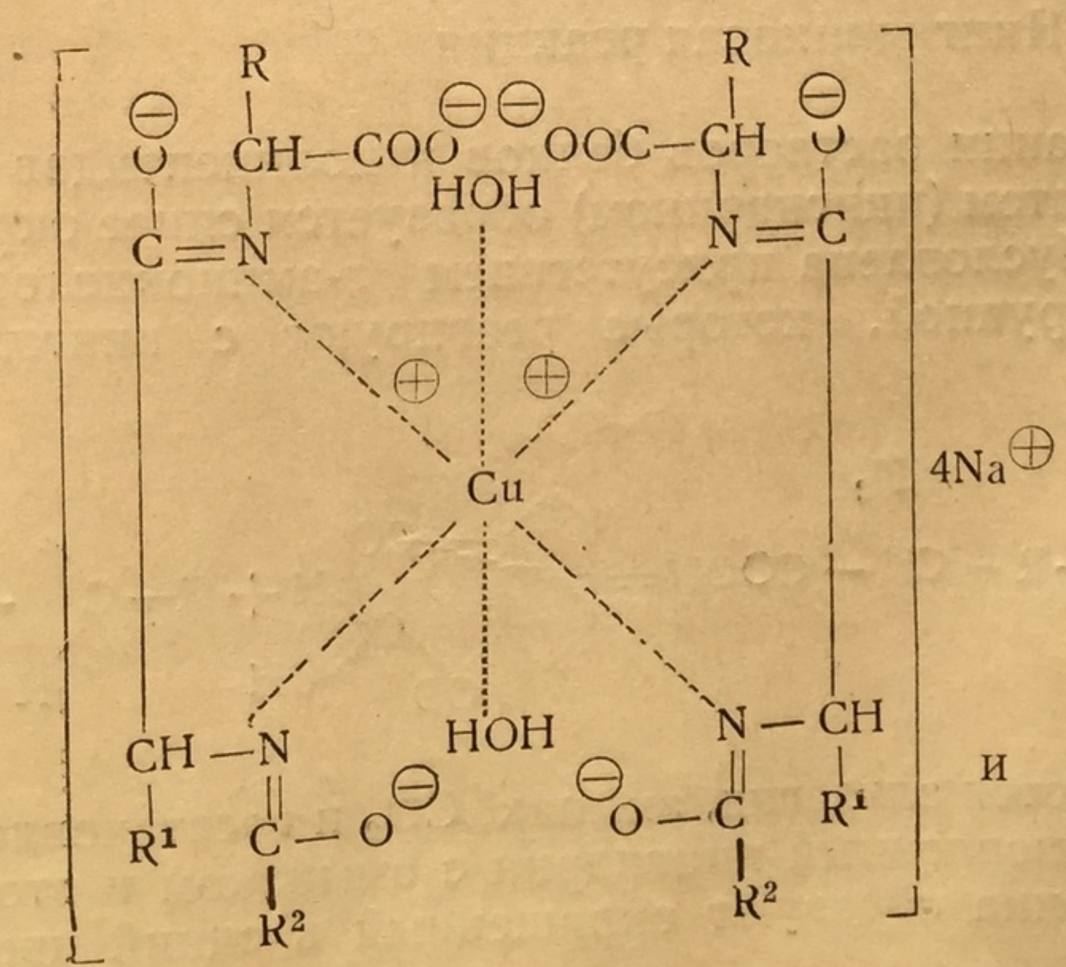


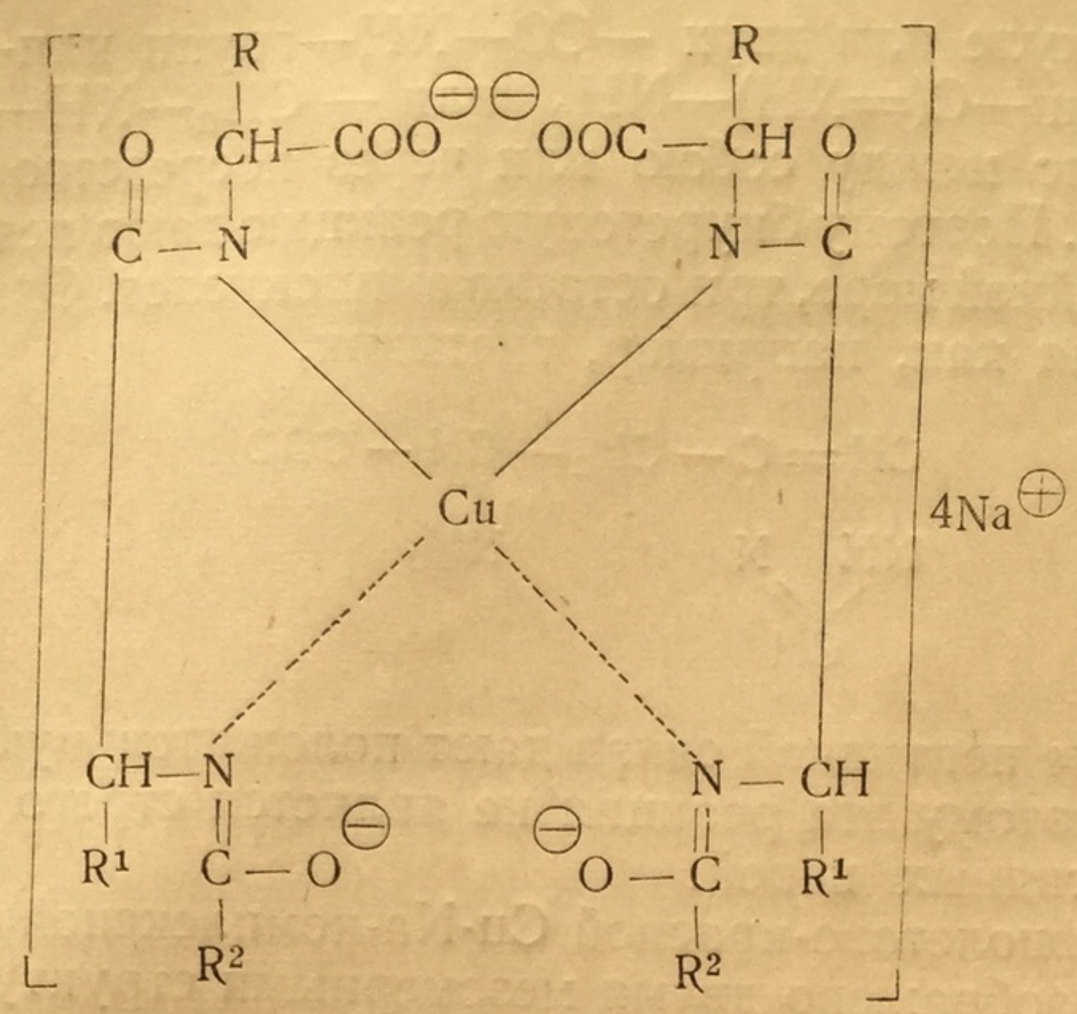
не содержащие пептидной связи дают положительную биуретовую реакцию и поэтому эта реакция не является строго специфичной для полипептидных цепей.

Строение фиолетово-красной Cu-Na-комплексной соли биурета может быть изображено двумя мезомерными структурами:



Аналогично фиолетовая Cu-Na-комплексная соль полипептидов и белков, цвет которой обусловливает окраску при биуретовой реакции, должна иметь строение, изображаемое следующими схематическими формулами:





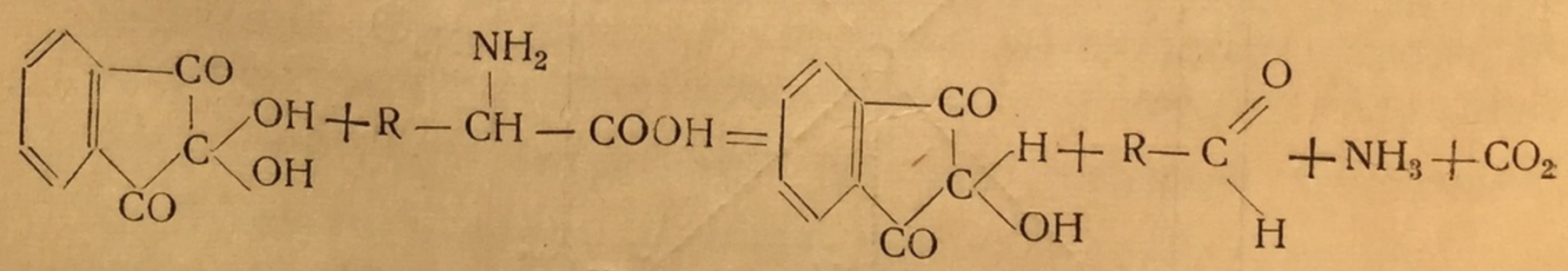
Пептоны при обычном проведении биуретовой реакции дают красноватую окраску. Однако и здесь при добавлении достаточного избытка соли меди получается сине-фиолетовое окрашивание.

Присутствие в исследуемом растворе $MgSO_4$ и $(NH_4)_2SO_4$ препятствует биуретовой реакции. При наличии аммонийных солей следует употреблять большой избыток едкой щелочи. Биуретовая реакция употребляется и для количественного определения белков.

К раствору белка добавляют равный объем 10%-ного раствора едкого натра и затем по каплям 0,1%-ный раствор сернокислой меди. Жидкость приобретает фиолетовую окраску. Реакцию повторяют с раствором пептона, казеина и желатины.

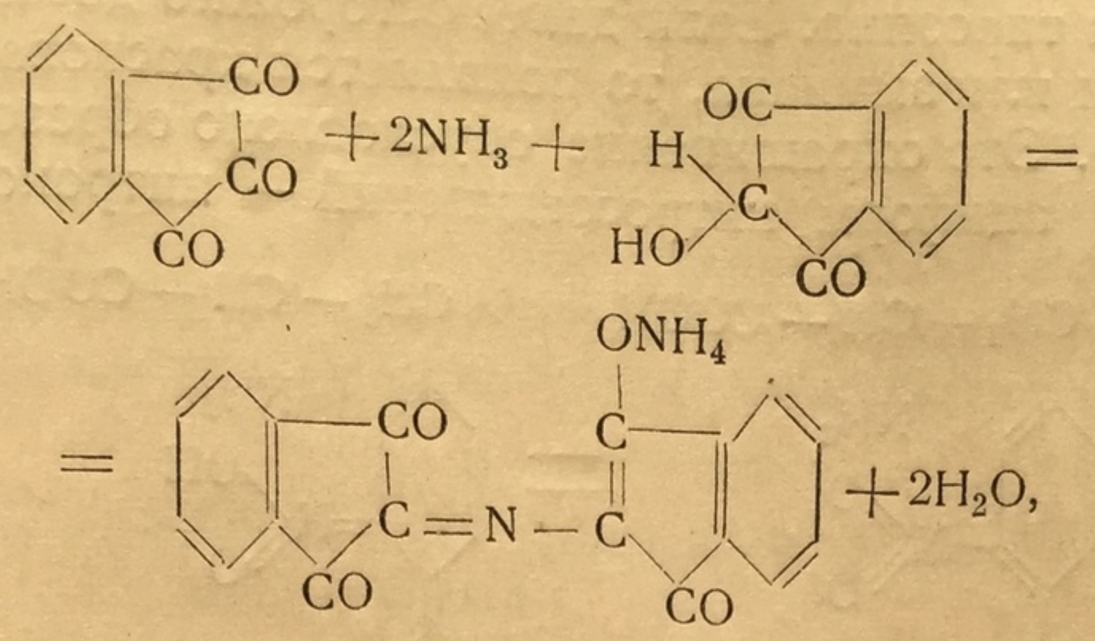
Работа 97. **Нингидриновая реакция**

При нагревании растворов белков и полипептидов с трикетогидринденгидратом (нингидрином) образуется синее окрашивание. Эта реакция обусловлена присутствием α-аминокислот с свободной α-аминогруппой, которые реагируют с нингидрином по уравнению:



причем образуются альдегид, аммиак, CO_2 и восстановленный нингидрин. Восстановленный нингидрин с аммиаком и второй молекулой нингидрина образуют окрашенный в синий цвет продукт

конденсации:



строение которого аналогично строению мурексида[1] (см. работу 149). Окраска чувствительна к [H·], и нингидриновую реакцию ведут в нейтральном растворе. Кроме того, следует иметь в виду, что аммиак и β-аланин также дают положительную нингидриновую реакцию. Чувствительность нингидриновой реакции может быть повышена добавлением аскорбиновой кислоты.

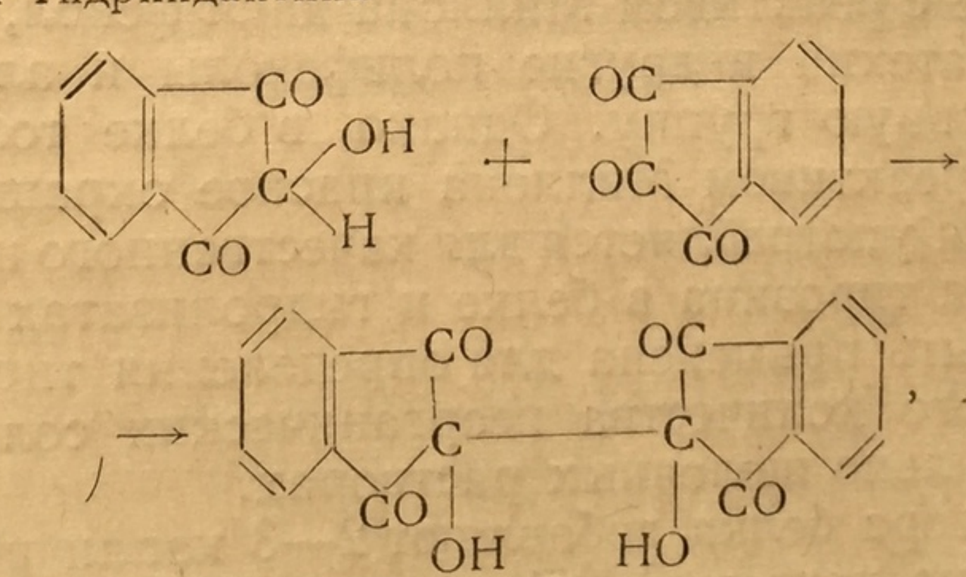
К 3 мл раствора белка добавляют 1 мл свежеприготовленного 0,1% раствора нингидрина. Смесь нагревают до кипения и через минуту охлаждают. Появляется красивое синее окрашивание.

Работа 98. **Ксантопротеиновая реакция (реакция на тирозин, триптофан, фенилаланин)**

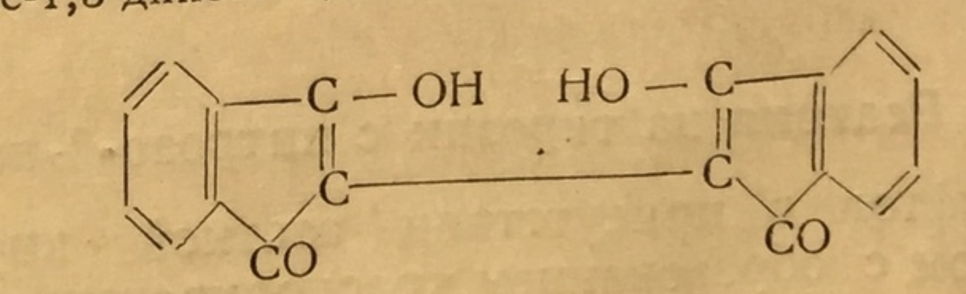
Если смешать раствор белка с концентрированной азотной кислотой, то выпадает осадок белка, который при нагревании смеси частью растворяется с образованием желтоокрашенного раствора. При этом происходит образование нитросоединений

---

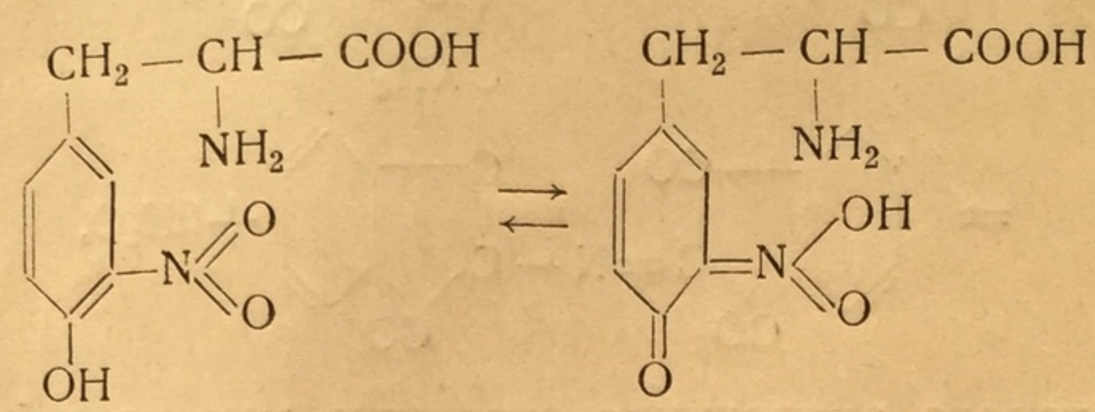
[1] По отдельным наблюдениям окраска нингидриновой реакции обусловлена образованием гидриндантина



дающего в слабощелочных растворах синее окрашивание, и окрашенного в фиолетовый цвет бис-1,3-дикетоинданила.



триптофана и тирозина. Если далее осторожно добавить раствора едкой щелочи или аммиака, то появляется красновато-оранжевое окрашивание. Это окрашивание обусловлено образованием солей таутомерных ациформ нитросоединений — нитроновых кислот:



Триптофан дает более яркокрасную окраску, чем тирозин. Фенилаланин не нитруется при действии одной азотной кислоты, но при добавлении концентрированных серной и азотной кислот нитрование идет. Ксантопротеиновая реакция получается лучше с сухими препаратами белка.

К раствору белка или к сухому казеину добавляют по каплям концентрированную азотную кислоту и затем нагревают до кипения. По охлаждении осторожно добавляют по каплям концентрированный раствор едкого натра или аммиака. Появляется оранжево-красное окрашивание.

Работа 99. **Реакция на тирозин (реакция Миллона)**

При добавлении к раствору белка реактива Миллона, содержащего азотную и азотистую закисную ртуть, образуется вначале белый осадок, который при нагревании делается красным. Реакция эта обусловлена образованием ртутной соли нитросоединения тирозина. Триптофан дает желтоватое окрашивание. Красное окрашивание с реактивом Миллона дают фенол, салициловый альдегид, пирокатехин и другие полифенолы и алкалоиды, содержащие фенольную группу. Однако, в белке только тирозин может давать с реактивом Миллона красное окрашивание и поэтому эта реакция употребляется для качественного и количественного определения тирозина в белке и гидролизатах белка. Реакция не может быть применена для определения тирозина в присутствии большого количества неорганических солей (например в моче) или в сильно щелочных растворах.

К 2 мл раствора белка добавляют 2—3 капли реактива Миллона и осторожно нагревают. Появляется красное окрашивание или белый осадок белка, образовавшийся вначале, делается красным.

Работа 100. **Реакция на тирозин с нитрозо-β-нафтолом**

Нитрозо-β-нафтол в присутствии азотной кислоты реагирует с тирозином с образованием краснокрашенного вещества

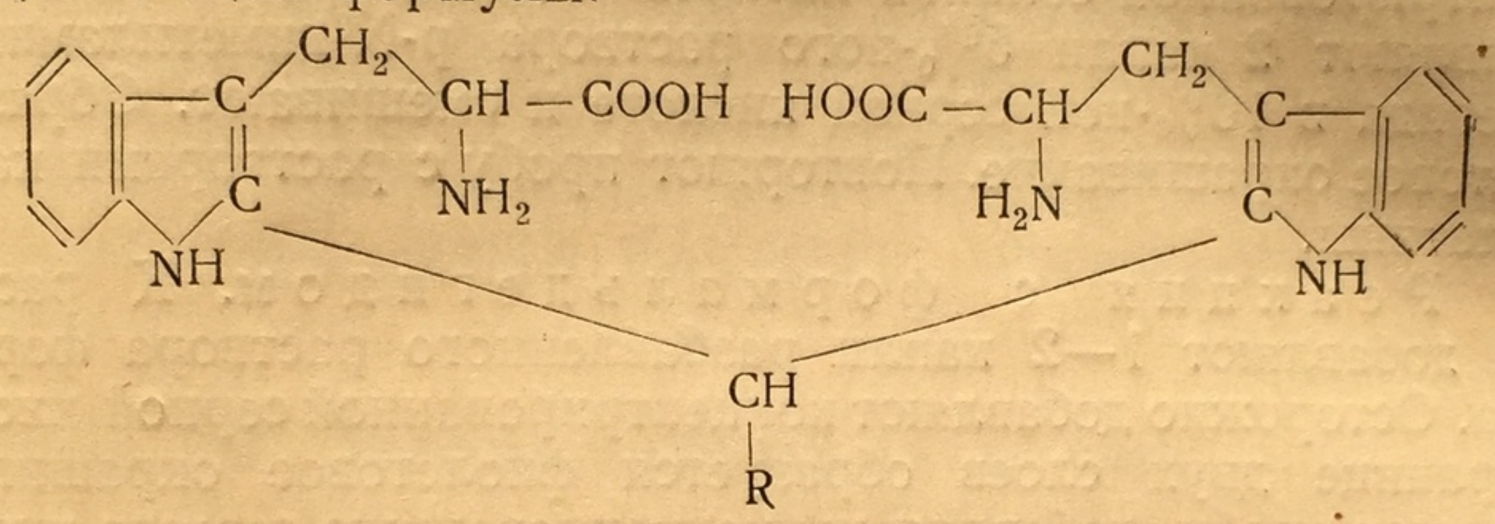
Реакция очень чувствительна и применима для белков и белковых гидролизатов.

К 1 мл 0,2% раствора казеина добавляют одну каплю 1%-ного спиртового раствора нитрозо-β-нафтола, нагревают до кипения и добавляют 1—2 капли концентрированной азотной кислоты. Появляется розовое или красное окрашивание.

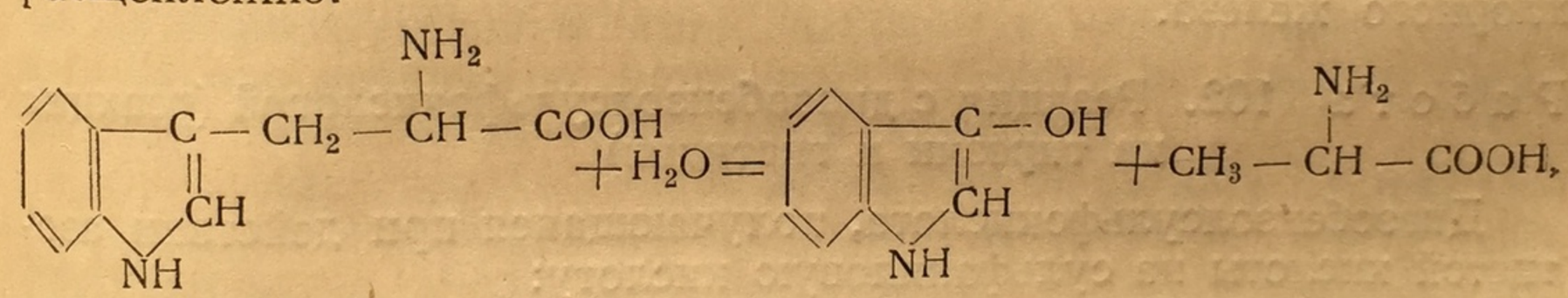
Повторяют пробу с раствором яичного белка и с раствором желатины.

Работа 101. **Реакции на триптофан (реакции конденсации с альдегидами)**

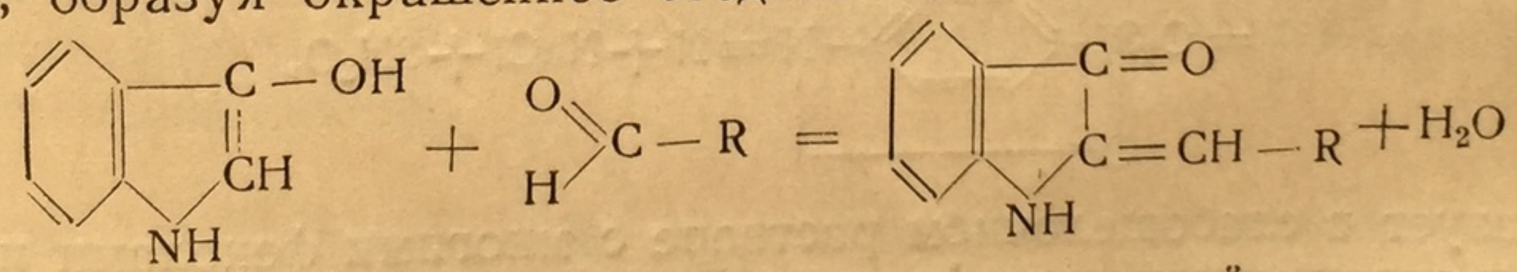
Триптофан в кислом растворе реагирует со многими альдегидами, в результате чего образуются окрашенные продукты конденсации общей формулы:



В отдельных случаях триптофан, повидимому, подвергается расщеплению:



после чего образовавшийся индоксил конденсируется с альдегидом, образуя окрашенное соединение:



Поэтому некоторые из нижеупомянутых реакций получаются также с индолом и его дериватами.

1. Реакция с глиоксилевой кислотой. К раствору белка прибавляют в избытке ледяную уксусную кислоту, подогревают до полного растворения и по охлаждении осторожно добавляют концентрированную серную кислоту. На границе двух слоев после некоторого стояния появляется красно-фиолетовое окрашивание.

Окраска получается вследствие взаимодействия триптофана с глиоксилевой кислотой (СОНСООН), находящейся в виде примеси в ледяной уксусной кислоте. Поэтому вместо ледяной ук-

сусной кислоты для реакции можно употреблять раствор глиоксилевой кислоты. Следы меди в реактивах значительно повышают интенсивность образующейся окраски.

2. Реакция с ω-оксиметилфурфуролом. Раствор белка смешивают с несколькими каплями 10%-ного раствора сахарозы и осторожно добавляют концентрированную серную кислоту. На месте соприкосновения двух слоев появляется вишнево-красное окрашивание.

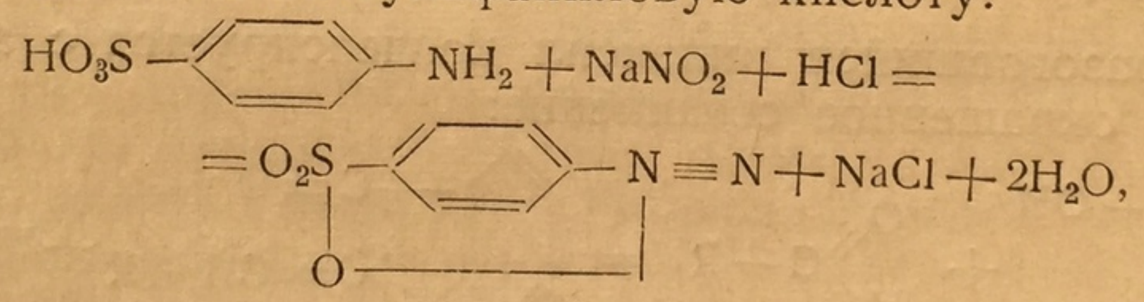
Окраска появляется вследствие реакции триптофана с ω-оксиметилфурфуролом, образующимся при действии концентрированной серной кислоты на сахарозу.

3. Реакция с p-N-диметиламинобензальдегидом. Добавляют к 1 мл раствора белка равный объем концентрированной соляной кислоты и доводят смесь до кипения. Прибавляют 2 капли 5%-ного раствора p-N-диметиламинобензальдегида в 10%-ной серной кислоте и смешивают. Образуется фиолетовое окрашивание. Повторяют пробу с растворами казеина и желатины.

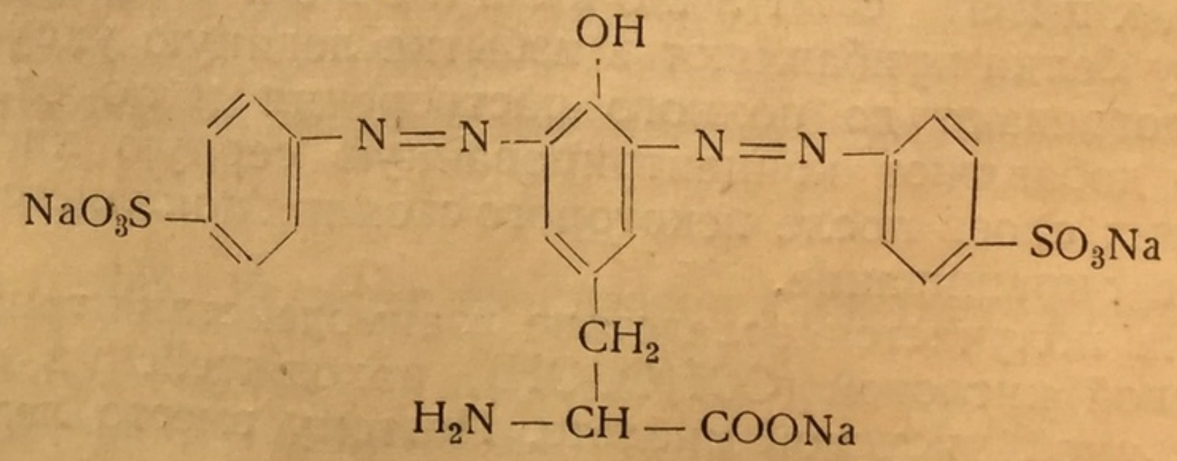
4. Реакция с формальдегидом. К раствору белка добавляют 1—2 капли разбавленного раствора формальдегида. Осторожно добавляют концентрированной серной кислоты. На границе двух слоев образуется фиолетовое окрашивание. Повторяют пробу, добавляя концентрированную серную кислоту, на каждые 10 мл которой добавлена одна капля 0,02% раствора хлорного железа.

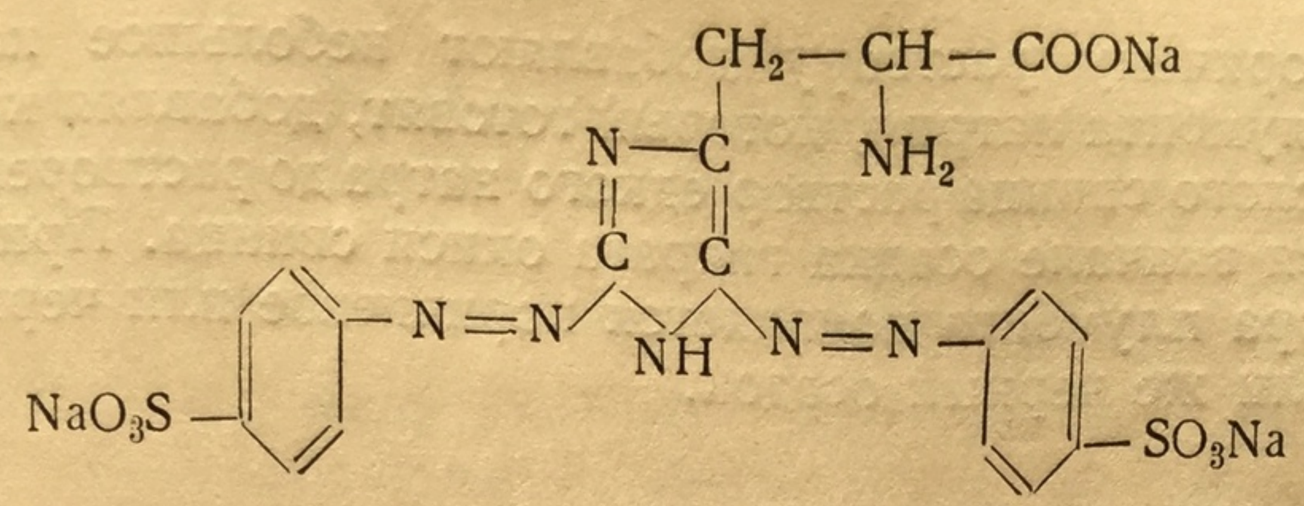
Работа 102. **Реакция с диазобензолсульфокислотой (реакция на тирозин и гистидин)**

Диазобензолсульфокислота, получающаяся при действии азотистой кислоты на сульфаниловую кислоту:



образует в слабощелочном растворе с многими фенолами и аминами окрашенные азосоединения. В составе белка только две аминокислоты — тирозин и гистидин — образуют с нею краснокрашенные азосоединения.





Гистидин дает окраску при очень малых концентрациях. Окрашенные соединения с диазобензолсульфокислотой дают также некоторые биологически важные вещества, как, например, карнозин (β-аланилгистидин), гистамин, эрготионеин, тирамин, адреналин и желчные пигменты.

К 3 мл 0,5% раствора сульфаниловой кислоты в 2%-ной соляной кислоте при охлаждении льдом добавляют равный объем 0,5%-ного раствора нитрита натрия. Затем, после минутного стояния, добавляют 1 мл полученного раствора к 1 мл раствора белка. Смешивают и прибавляют 10%-ного раствора соды до ясной щелочной реакции, причем появляется вишнево-красное окрашивание.

Работа 103. **Реакция с бромом на гистидин**

Эта реакция специфична для гистидина и может служить для его количественного определения. Только гистидин дает сине-фиолетовую окраску; гистамин дает желтую или оранжевую окраску. Однако, реакция не применима к белкам, а только к гидролизатам белка после специальной обработки.

К 2 мл раствора гистидина добавляют по каплям 1%-ный раствор брома в 30%-ной уксусной кислоте до появления желтого окрашивания, не исчезающего за 10 минут. Тогда добавляют 2 мл смеси из 2 частей концентрированного раствора аммиака и 1 части 10%-ного раствора углекислого аммония и нагревают в течение 5 минут на кипящей водяной бане. Появляется сине-фиолетовое окрашивание.

Работа 104. **Реакция на серусодержащие аминокислоты**

При нагревании белка в сильно щелочном растворе серусодержащие аминокислоты — цистеин, цистин и метионин — отщепляют серу в виде щелочного сульфида,

$$R \cdot SH + 2NaOH = R \cdot OH + Na\ S + H_2O,$$

который при добавлении свинцовой соли образует черный сернистый свинец. Эрготионеин также дает эту реакцию.

Раствор белка кипятят с двойным объемом 10%-ного раствора едкого натра. При этом можно заметить выделение аммиака и по запаху и по посинению влажной лакмусовой бумаги. К полу-

ченному горячему раствору добавляют небольшое количество раствора плумбита натрия, который готовят, добавляя к раствору уксуснокислого свинца раствор едкого натра до растворения образовавшегося вначале осадка гидрата окиси свинца. При добавлении раствора плумбита появляется коричневое или черное окрашивание или же черный осадок.

Работа 105. **Реакция на метионин**

Нитропруссид натрия образует с метионином и гликоколлом красный пигмент. Если вести реакцию в сильно щелочной среде, то присутствие других аминокислот (гистидина и триптофана) не влияет на образующуюся окраску. Однако, присутствие значительных количеств цистина препятствует определению. Метод применим к белковым гидролизатам.

5 мл исследуемого раствора смешивают с 1 мл 14,3 н. NaOH (57,2 г NaOH в 100 мл воды), 1 мл 1%-ного раствора гликоколла и 0,3 мл 10%-ного раствора нитропруссида натрия и затем нагревают 10 минут при 35—40°. Охлаждают в ледяной воде и добавляют 5 мл смеси $HCl+H_3PO_4$ (9 объемов концентрированной HCl + 1 объем 85%-ной H_3PO_4). Встряхивают в течение одной минуты и охлаждают.

Получающаяся окраска может быть сравнена с окраской, полученной таким же образом с раствором метионина известной концентрации, и тогда эта реакция может служить для количественного определения метионина.

Работа 106. **Реакция на аргинин**

При действии гипохлорита или гипобромита натрия α-нафтол конденсируется с метилгуанидином, агматином, гликоциамином, аркаином и аргинином с образованием краснокрашенных пигментов. В белках аргинин — единственная аминокислота, дающая эту реакцию, и поэтому она может применяться для качественного и количественного определения аргинина в белках. Аммиак, гистидин, тирозин и триптофан могут мешать определению.

1. К раствору белка прибавляют щелочной раствор α-нафтола и затем небольшое количество раствора хлорноватистокислого натрия. Появляется красное окрашивание.

2. Помещают в пробирку 5 мл исследуемого раствора белка и охлаждают льдом. Добавляют 1 мл 10%-ного раствора едкого натра и 1 мл 0,02%-ного щелочного раствора α-нафтола. Охлаждают льдом еще 2—3 минуты и добавляют 10—20 капель раствора гипобромита (2 г брома в 100 мл 5%-ного едкого натра). Появляется красное окрашивание. Оно довольно быстро начинает исчезать из-за дальнейшего окисления образовавшегося пигмента избытком гипобромита. Для того, чтобы стабилизировать окрас-

ку, к жидкости добавляют 1 мл 40%-ного раствора мочевины, раскисляющей избыточный гипобромит.

Работа 107. **Реакция на гликоколл (глицин)**

Диальдегид о-фталевой кислоты реагирует с аммиаком и некоторыми аминокислотами с образованием окрашенных продуктов. При реакции с глицином, триптофаном и аммиаком эти окрашенные продукты реакции растворимы в хлороформе, с другими аминокислотами они или не образуются или нерастворимы в хлороформе. Реакция эта может быть использована для открытия глицина, если предварительно удалить триптофан и аммиак.

К 5 мл 0,02%-ного раствора глицина добавляют 2 мл м./15 фосфатного буфера с pH = 8,0 и реактива, содержащего диальдегид орто-фталевой кислоты. Перемешивают и через две минуты добавляют свежеприготовленную и охлажденную смесь 6 мл алкоголя и 1 мл концентрированной серной кислоты. Перемешивают, добавляют 10 мл хлороформа и хорошо встряхивают. Слой хлороформа окрашивается в зеленый цвет.

Работа 108. **Реакция Подобедова**

Многие белки содержат остаток, имеющий свойства углевода, обнаруживаемый с помощью общей реакции на углеводы (см. работу 44). К раствору белка добавляют несколько капель 10%-ного алкогольного раствора α-нафтола и затем осторожно добавляют концентрированной серной кислоты. На границе двух слоев появляется фиолетовое кольцо.

МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТ, ПОЛИПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

Одной из главных задач при химическом изучении белков и полипептидов является исследование их аминокислотного состава. Аминокислотный состав, наряду с величиной молекулярного веса, положением изоэлектрического пункта и растворимостью, служит основной характеристикой белков и полипептидов.

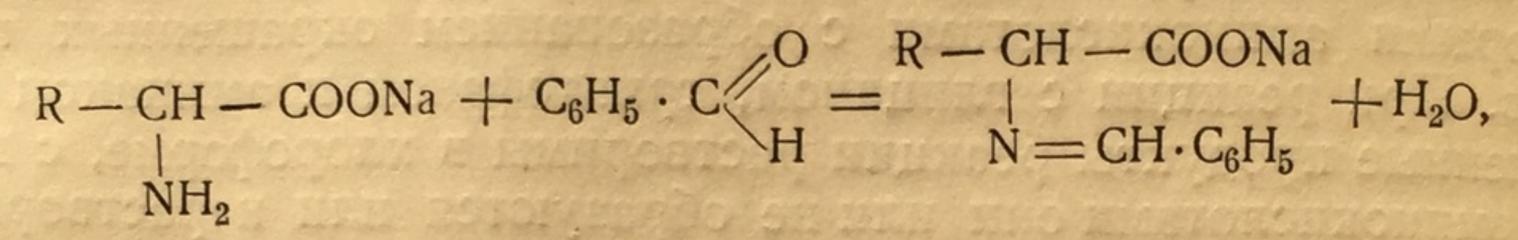
Кроме того, часто возникает необходимость определения как общего содержания аминокислот и полипептидов в растворе, так и тех изменений, которые сопровождают гидролиз белков и полипептидов. Неферментативный и ферментативный гидролиз белков и полипептидов сопровождается образованием эквивалентных количеств свободных карбоксильных и аминогрупп:

$$-CO-NH- + H_2O \rightleftarrows -COOH + H_2N-$$

Количественное определение этих групп дает возможность определить общее содержание аминокислот и полипептидов и следить за течением гидролитического расщепления. В применении к ферментативным реакциям метод может служить для изучения действия протеаз и пептидаз.

Работа 109. **Выделение аргинина из белковых гидролизатов**

Для выделения аргинина из гидролизата белка может служить или образование трудно растворимого бензилиденаргинина, при действии бензальдегида на соль аргинина:



$$R-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COONa + C_6H_5\cdot C\begin{matrix}\diagup O\\ \diagdown H\end{matrix} = R-\underset{\underset{N=CH\cdot C_6H_5}{|}}{CH}-COONa + H_2O,$$

или же образование трудно растворимой соли аргинина с флавиановой кислотой (2,4-динитро-1-нафтол-7-сульфокислота).

1. Выделение в виде бензилиденаргинина. 100 г желатины смешивают с 200 мл концентрированной соляной кислоты (уд. веса 1,19) и после десятичасового стояния нагревают при кипении с обратным холодильником в течение 8 часов. Жидкость обесцвечивают кипячением с животным углем и затем упаривают при пониженном давлении при 50° до состояния сиропа. Добавляют равный объем воды и снова упаривают. К остатку добавляют 50 мл воды и затем при охлаждении льдом и помешивании прибавляют, избегая разогревания, 30%-ный едкий натр до нейтральной реакции. Добавляют еще 10 мл 30%-ного раствора едкого натра и отфильтровывают от выпавших загрязнений. К полученному фильтрату прибавляют по частям 20—25 мл свежеперегнанного бензальдегида, хорошо перемешивая жидкость. При потирании палочкой или заражении кристаллами происходит быстрая кристаллизация бензилиденаргинина. После двух-трех часового стояния при 0° она закончена. Тогда отсасывают осадок, промывают его холодной водой и затем смесью эфира и алкоголя для удаления остатков бензальдегида. Кристаллы, высушенные в эксикаторе, бесцветны и имеют температуру плавления 204°. Выход 7—8 г.

2. Выделение в виде флавианата. 100 г желатины гидролизуют как и в предыдущем случае. По окончании гидролиза жидкость охлаждают, разбавляют водой до объема 500 мл, нейтрализуют при охлаждении добавлением 30%-ного едкого натра и затем подкисляют добавлением уксусной кислоты. Жидкость фильтруют и к теплому фильтрату добавляют горячий раствор 20 г флавиановой кислоты в 100 мл воды. После 48-часового стояния выпавший желто-оранжевый осадок флавианата отсасывают, промывают водой и высушивают. Выход около 20 г. Флавианат может быть перекристаллизован из 5%-ной серной кислоты.

Осаждение аргинина из белковых гидролизатов при добавлении избытка флавиановой кислоты может служить и в качестве способа количественного определения аргинина. 1 г флавианата отвечает 0,3566 г аргинина.

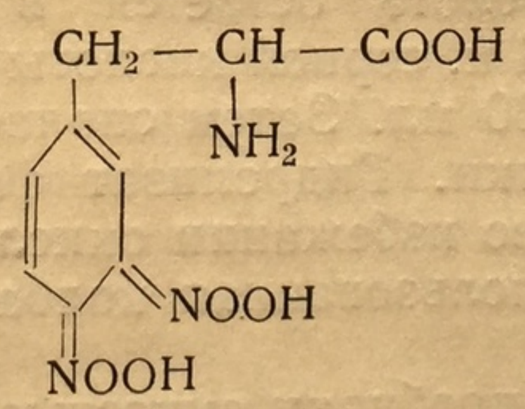
Работа 110. **Колориметрическое определение триптофана**

Если к раствору, содержащему свободный триптофан или белок, в состав которого входит триптофан, добавить *p*-*N*-диметиламинобензальдегида, $NaNO_3$ и концентрированной кислоты, то образуется синее окрашивание, интенсивность которого пропорциональна концентрации триптофана. В присутствии желатины эта окраска устойчива и достаточно интенсивна, чтобы она могла быть использована для колориметрического определения.

Растворяют 10—20 мг белка в 3,5 мл 1%-ного раствора желатины в 1,0 н. NaOH. Если белок плохо растворяется, то жидкость кипятят с обратным холодильником около часа. По охлаждении добавляют, при помешивании, 0,5 мл 2,5%-ного раствора *p*-диметиламинобензальдегида в 10%-ной серной кислоте, затем 0,2 мл 2%-ного раствора $NaNO_3$ и, наконец, 28 мл концентрированной соляной кислоты. Оставляют на 30 минут и затем переносят, споласкивая 50%-ным алкоголем, в мерную колбу на 100 мл. Доводят объем до 100 мл добавлением 50%-ного алкоголя. Колориметрируют, сравнивая интенсивность полученной окраски с окраской стандартного раствора триптофана (1%-ный раствор желатины в 1,0 н. NaOH, содержащий в 1 мл 0,2 или 0,4 мг триптофана), обработанного таким же образом, как и раствор с неизвестной концентрацией.

Работа 111. **Колориметрическое определение фенилаланина**

При нитровании фенилаланина нитрующей смесью, после дальнейшего восстановления с гидроксиламином в растворе аммиака, образуется фиолетово-окрашенная соль соединения следующего строения:



Эта цветная реакция в белковых гидролизатах специфична для фенилаланина.

Отмеривают в две фарфоровые чашки для выпаривания объемы белкового гидролизата, отвечающие, приблизительно, 0,75 мг и 1,5 мг фенилаланина. В две другие чашки отмеривают 3 мл и 6 мл стандартного раствора фенилаланина, содержащего в 1 мл 0,25 мг аминокислоты. Выпаривают досуха содержимое чашек на водяной бане. По охлаждении добавляют по 2 мл нитрующей смеси (раствор 20 г KNO_3 в 100 мл концентрированной серной кислоты) и нагревают на водяной бане 20 минут. Переносят содержимое чашек, споласкивая водой, в мерные колбы на 25 мл, следя за тем, чтобы

объем жидкости не был больше 10 мл. Охлаждают во льду. Теперь в колбу с стандартным образцом и в колбу с раствором неизвестной концентрации, близкой к этому стандарту, добавляют по 2,5 мл 30%-ного раствора гидрохлорида гидроксиламина. Быстро охлаждают во льду и доводят до 25 мл добавлением охлажденного льдом концентрированного раствора аммиака (уд. веса 0,9). Смешивают, оставляют при комнатной температуре и через 40 минут сравнивают окраски в колориметре. Такой же обработке и колориметрированию подвергают два других опыта.

Работа 112. **Колориметрическое определение тирозина**

В основе метода лежит образование окрашенного соединения при реакции Миллона. Эта реакция в белках специфична для тирозина, но она неприменима в присутствии фенолов, полифенолов, а также в присутствии хлоридов и большого количества минеральных солей. Триптофан предварительно удаляют осаждением в виде ртутного соединения.

В сухую колбу Кьельдаля из хорошего стекла емкостью 250 мл вносят около 1 г сухого белка, 2 мл бутилового спирта и спираль из серебряной проволоки (для предотвращения толчков и вскипания) и затем 4 г едкого натра в виде 20%-ного раствора. В шейку колбы вставляют конденсатор, охлаждаемый водой, и смесь кипятят 18—20 часов. Снимают конденсатор и кипятят еще 10 минут для удаления спирта, добавив 10 мл воды. Затем прекращают нагревание и осторожно, к еще горячему раствору, добавляют по каплям 10 мл 14 н. серной кислоты (200 мл концентрированной H_2SO_4 и воды до 500 мл). Необходимо, чтобы смесь при этой операции вскипала и была горячей, так как иначе выщелоченная из стекла кремневая кислота остается в коллоидном растворе. Добавляют еще 5 мл 14 н. серной кислоты и переносят гидролизат в мерную колбу на 100 мл. Затем споласкивают колбу водой и доводят водой до метки. Гидролизат фильтруют и сохраняют на холоду в темноте (во избежании окисления). Обычно для вторичного гидролиза использованная колба бывает уже непригодной.

В центрифужную пробирку емкостью 15 мл вносят 8 мл полученного гидролизата и добавляют по каплям 4 мл 15%-ного раствора сернокислой ртути в 6 н. серной кислоте. Смесь оставляют на 2—3 часа и центрифугируют 5 минут. Снимают прозрачную жидкость и переносят в мерную колбу на 100 мл. Затем добавляют к осадку в пробирке, содержащему триптофан и некоторое количество тирозина, 10 мл 1,5%-ного раствора $HgSO_4$ в 2 н. серной кислоте, перемешивают, оставляют стоять 10 минут и центрифугируют. Жидкость переносят в ту же колбу на 100 мл, присоединяя к первой.

Во вторую колбу на 100 мл вносят 5 мл стандартного раствора тирозина в 2 н. серной кислоте, содержащего 1 мг в 1 мл. Добав-

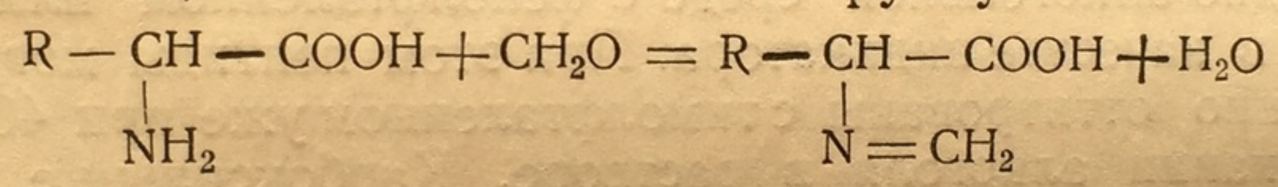
ляют 4 мл 15%-ного раствора сернокислой ртути в 6 н. H_2SO_4 и 10 мл 1,5%-ного раствора сернокислой ртути в 2 н. H_2SO_4.

В колбы с исследуемым и стандартным растворами добавляют по 6 мл 7 н. серной кислоты, нагревают на кипящей водяной бане 15 минут, охлаждают до комнатной температуры и прибавляют в каждую колбу, при встряхивании, по 1 мл 2%-ного раствора нитрита натрия. Появляется розовое окрашивание. Жидкость в колбах доводят водой до метки и сейчас же колориметрируют.

Если при колориметрировании высота слоя стандартного раствора 20 мм, то 20, деленные на высоту слоя исследуемого раствора и умноженные на 1,25 и на 5, дают содержание тирозина в процентах, при условии, если навеска взятого для гидролиза белка точно 1 г.

Работа 113. **Формольное титрование**

Алкалиметрическое титрование карбоксильных групп или ацидиметрическое титрование аминогрупп в водных растворах с применением обычных индикаторов у таких амфолитов как аминокислоты, полипептиды и белки не дает верных результатов. Однако, алкалиметрическое титрование карбоксильных групп делается возможным, если его вести в присутствии избыточного формальдегида, связывающего аминогруппу:



$$R-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH+CH_2O=R-\underset{\underset{N=CH_2}{|}}{CH}-COOH+H_2O$$

В этих условиях аминогруппы аминокислот и полипептидов не препятствуют титрованию и карбоксильные группы могут быть количественно оттитрованы при добавлении щелочи до pH ≅ 9,0.

Для определения употребляют приготовленный непосредственно перед опытом нейтрализованный формалин (50 мл формалина, 1 мл 0,5%-ного водноалкогольного раствора фенолфталеина и 0,1 н. едкого натра до очень слабой розовой окраски).

К 10 мл прокипяченной и охлажденной воды добавляют 5 мл формалина и 5 мл 0,1 н. раствора едкого натра и затем 0,1 н. серной кислоты до слаборозовой окраски. После этого добавляют 2 капли 0,1 н. едкого натра. Появляется яркокрасная окраска, соответствующая pH = 8,8. Теперь к 10 мл 0,1 н. раствора глиококолла прибавляют 5 мл формалина и титруют смесь 0,1 н. раствором едкого натра до ясно красной окраски — более сильной, чем окраска в контрольном опыте. Добавляют 0,1 н. серной кислоты до слаборозовой окраски и затем несколько капель 0,1 н. раствора едкого натра до яснокрасной окраски,— такой же, как в контрольном опыте (pH = 8,8). Теперь к контрольному опыту добавляют 4 капли 0,1 н. едкого натра, причем появляется яркокрасная окраска, соответствующая pH = 9,1, и добавляют к основному опыту 0,1 н. едкого натра до появления такой же окраски.

Для расчета результатов определения вычитают из объема щелочи, пошедшей на основной опыт, объем затраченной в том

же опыте 0,1 н. кислоты и избыток щелочи, пошедший на контрольный опыт. Например, если в контрольном опыте пошло всего 5,1 мл 0,1 н. едкого натра и 4,3 мл 0,1 н. серной кислоты, то избыток щелочи составляет 5,1—4,3 = 0,8 мл. При основном титровании затрачено всего 11,0 мл 0,1 н. раствора едкого натра и 0,3 мл 0,1 н. серной кислоты. Отсюда на титрование 10 мл 0,1 н. раствора глиноколла пошло 11,0—(0,3+0,8) = 9,9 мл 0,1 н. раствора едкого натра.

При титровании описанным способом продуктов ферментативного расщепления белков, результаты определений удобно выражать в миллиграммах формольнотитруемого азота. Так как при гидролизе белков амино- и карбоксильные группы образуются в равных количествах, то 1 мл 0,1 н. раствора едкого натра, затраченного при формольном титровании, соответствует 1,4 мг азота.

Работа 114. Титрование карбоксильных групп аминокислот, полипептидов и белков в водно-алкогольном растворе

Влияние аминогрупп на результаты титрования карбоксильных групп аминокислот и полипептидов можно исключить не только действием формальдегида, но и при применении титрования в водно-алкогольной среде с фенолфталеином или тимолфталеином в качестве индикатора. При этом пептиды могут быть количественно оттитрованы с тимолфталеином уже при 40—50%-ном содержании алкоголя в растворе. Карбоксильные группы свободных аминокислот при этом оттитровываются только на 28% и количественно определяются лишь при 90—97% содержании алкоголя в растворе. Такое различие делает возможным количественное определение аминокислот и пептидов при одновременном их присутствии в белковых гидролизатах и других биологических объектах. При титровании белков по этому методу могут возникать затруднения из-за коагуляции белка при добавлении алкоголя. В таких случаях титрование ведут при низких концентрациях белка и при нагревании. В случае желатины для предотвращения коагуляции добавляют хлористый кальций перед титрованием.

К 10 мл нейтрального на лакмус раствора, полученного при ферментативном гидролизе белка и содержащего продукты расщепления, добавляют 10 мл 96% спирта, несколько капель 0,5%-ного спиртового раствора тимолфталеина и титруют раствор до появления слабого зелено-синего окрашивания с 0,2 н. спиртовым раствором КОН. Затем добавляют 90 мл 96%-ного спирта, причем окраска исчезает, и снова титруют с 0,2 н. спиртовым раствором КОН до появления зелено-синего окрашивания. После стояния в течение нескольких минут окраска может снова исчезнуть, что обусловлено гидролизом белка, находящегося в растворе. По окончании титрования ставят контрольный опыт, в котором определяют количество щелочи, расходуемой на титрование

взятого для определения количества спирта, и найденную величину вычитают из результатов основного титрования.

Содержание аминокислот и полипептидов в исследуемом растворе, выраженное в мл 0,2 н. раствора КОН, можно найти следующим образом. Если на первое титрование пошло A мл щелочи, а на первое и второе титрование B мл щелочи, то

$$A = y + \frac{28}{100}x \quad \text{и} \quad B = y + x,$$

где: x-миллилитры щелочи, идущие на титрование аминокислот, а y-миллилитры щелочи, идущие на титрование полипептидов. Отсюда $y = B - x$ и $x = (B - A)\ 100/72$. Таким образом, если на первое титрование пошло 6,2 мл 0,2 н. раствора КОН, а на первое и второе — 11,5 мл 0,2 н. раствора КОН, то количество миллилитров 0,2 н. щелочи, израсходованное на титрование аминокислот, будет

$$x = (11{,}5 - 6{,}2)\frac{100}{72} = 7{,}3 \text{ мл},$$

а количество миллилитров 0,2 н. щелочи, израсходованное на титрование полипептидов:

$$11{,}5 - 7{,}3 = 4{,}2 \text{ мл}.$$

В зависимости от концентрации исследуемого раствора, при таком титровании пользуются от 1,0 н. до 0,05 н. спиртовыми растворами КОН. Ошибка при титровании 0,2 н. раствором КОН составляет около 0,04 мл.

Работа 115. **Газометрическое определение свободных аминогрупп по Ван-Слайку**

Свободные первичные аминогруппы аминокислот, полипептидов и белков реагируют с азотистой кислотой по уравнению:

$$R - NH_2 + HNO_2 = R - OH + N_2 + H_2O$$

Эта реакция протекает количественно в течение 5—10 минут, если ее вести при обычной температуре в среде ледяной или 80%-ной уксусной кислоты. В нашей лаборатории установлено, что при тех же условиях такое же количественное протекание этой реакции наблюдается и при употреблении вместо уксусной кислоты 1,5 н. серной кислоты.

Одновременно с азотом выделяются и окислы азота, образующиеся при распаде азотистой кислоты:

$$3HNO_2 = HNO_3 + 2NO + H_2O$$

Выделившиеся азот и окислы азота собирают и поглощают окислы азота щелочным раствором перманганата

$$2NO + O_2 + H_2O = HNO_2 + HNO_3$$
$$HNO_2 + HNO_3 + 2NaOH = NaNO_2 + NaNO_3 + 2H_2O,$$

а оставшийся азот собирают и измеряют его объем. Очевидно, что 1/2 найденного таким образом азота является азотом амино-групп.

Вторичный азот триптофана, пролина и оксипролина, вторичный и третичный азот гистидина, гуанидиновая группа аргинина и амидная группа аспарагина не реагируют с азотистой кислотой. Первичная аминогруппа большинства аминокислот количественно реагирует с азотистой кислотой. Однако, глицин и цистин образуют более теоретического количества аминоазота (103—107%). Глицинпептиды образуют до 120% теоретического количества азота. Лизин реагирует с азотистой кислотой α-и ε-аминогруппами, причем ε-аминогруппа реагирует медленнее.

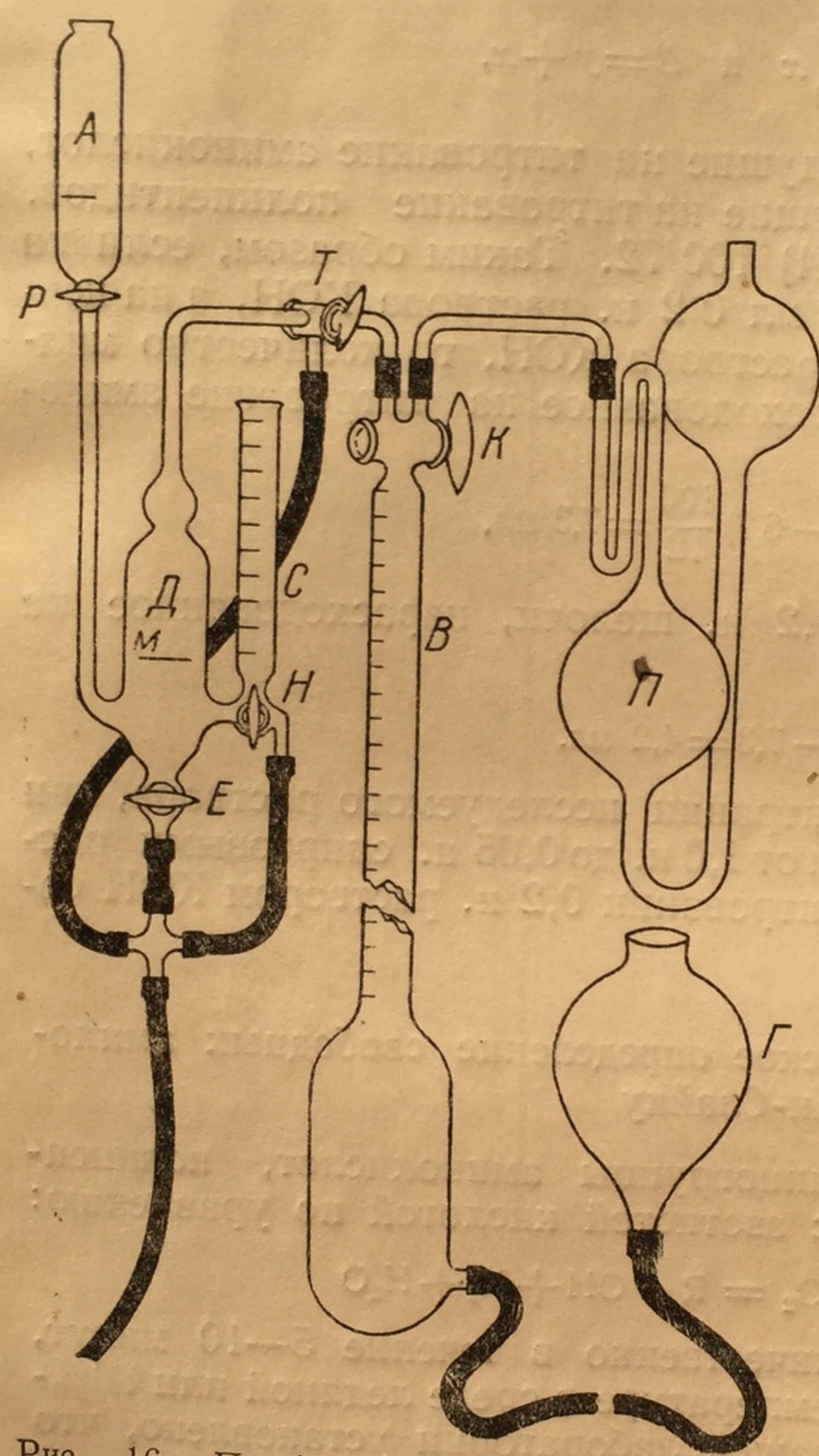


Рис. 16. Прибор для газометрического определения аминоазота.

Мочевина реагирует с азотистой кислотой с выделением азота

$$CO(NH_2)_2 + 2HNO_2 = CO_2 + 2N_2 + H_2O$$

также, как и аммиак, пуриновые основания и креатинин и поэтому в присутствии значительных количеств этих веществ определение не может дать верных результатов. Кроме того, в присутствии низших алкоголей, ацетона, пировиноградной кислоты, фенолов и полифенолов образуется газ, непоглощаемый щелочным раствором перманганата, и поэтому эти вещества не должны содержаться в заметных количествах в исследуемом растворе.

При определениях в растворах белков наблюдается иногда сильное вспенивание. Для устранения такого вспенивания жидкости к ней добавляют каприловый алкоголь.

Определение аминоазота ведут в приборе (рис. 16). Прежде чем приступить к определению, наполняют гемпелевскую пипетку *П* прибора щелочным раствором перманганата (50 г $KMnO_4$ и 25 г KOH в 1000 мл воды) так, чтобы нижний шар был наполнен

целиком, а верхний на $^1/_4$ своего объема. Газовую бюретку *В* и грушу *Г* заполняют водой, причем в капиллярах, соединяющих бюретку *В* с гемпелевской пипеткой *П* и с краном *Т*, не должно оставаться воздуха. В воронку *А* наливают до метки ледяной или 80%-ной уксусной кислоты, или 1,5 н. серной кислоты, и переводят, повертывая кран *Р*, 7 мл в сосуд для дезаминирования *Д*, при повернутом на соединение с наружной атмосферой (с канализацией) кране *Т*. После этого в сосуд *Д* через воронку *А* вводят 20%-ный раствор нитрита натрия, так чтобы сосуд *Д* был заполнен раствором до капилляра. Кран *Т* закрывают. В сосуде *Д* начинается выделение окислов азота, которое ускоряют встряхиванием сосуда. Несколько миллилитров газа выпускают через кран *Т* наружу и так поступают два-три раза для полного удаления остатков воздуха из *Д*. Теперь, при открытом кране *Р* и закрытом кране *Т*, начинают взбалтывать сосуд для дезаминирования *Д* до тех пор, пока выделяющиеся окислы азота не вытеснят жидкость из *Д* до метки *М*. Тогда закрывают кран *Р* и поворачивают краны *Т* и *К* так, чтобы сосуд *Д* соединялся с бюреткой *В*, и из градуированной воронки *С*, поворачивая кран *Н*, переводят в сосуд *Д* определенный объем исследуемого раствора. Сосуд для дезаминирования *Д* взбалтывают с помощью мотора и эксцентрика с постоянной скоростью в течение 5—10 минут. Теперь, опустив грушу *Г* и открыв кран *Р*, переводят весь газ из сосуда *Д* в бюретку *В*. При этом жидкость из сосуда *Д* должна достигнуть отверстия двухходового крана *К*. После этого поворотом двухходового крана *К* устанавливают соединение газовой бюретки *В* с пипеткой Гемпеля *П* и, поднимая грушу *Г*, переводят газ в пипетку для поглощения окислов азота. Пипетку *П* встряхивают в течение одной минуты с помощью мотора и эксцентрика, оставшийся непоглощенным газ переводят снова в бюретку *В* и измеряют его объем. Повторяют операцию поглощения окислов азота еще два-три раза, пока объем газа не перестанет изменяться (полное поглощение окислов азота). Тогда измеряют объем азота и отмечают температуру и атмосферное давление.

Во время всех этих операций кран *Р* поворачивают так, чтобы жидкость из сосуда *Д* могла вытесняться образующимися в *Д* газами в воронку *А*.

Теперь, чтобы убедиться в том, что реакция дезаминирования закончена, выпускают азот из бюретки *В* наружу через кран *Т* и, закрыв кран *Р*, встряхивают 5 минут сосуд *Д*. Скопившийся в *Д* газ переводят в бюретку В, а затем, для поглощения окислов азота, в пипетку *П*. После полного поглощения окислов азота измеряют объем непоглощенного газа в бюретке *В*. Если реакция дезаминирования прошла нацело, то при этом измеряется не более 0,1—0,2 мл азота, т. е. не более того количества его, которое выделяется из реактивов.

После окончания определения, открыв краны *Р* и *Е*, сливают в канализацию жидкость из сосуда *Д* и споласкивают его водой.

Таблица 16

Миллиграммы аминоазота, отвечающие 1 мл газообразного азота, собранного над водой при температуре 11—30° и давлении 728—770 мм

Температура (в °С) \ Давление (в мм)	728	730	732	734	736	738	740	742	744	746	748
11	0,5680	0,5695	0,5710	0,5725	0,5745	0,5760	0,5775	0,5790	0,5805	0,5820	0,5840
12	0,5655	0,5670	0,5685	0,5700	0,5720	0,5735	0,5750	0,5765	0,5780	0,5795	0,5815
13	0,5630	0,5645	0,5660	0,5675	0,5695	0,5710	0,5725	0,5740	0,5755	0,5770	0,5785
14	0,5605	0,5620	0,5635	0,5650	0,5665	0,5680	0,5700	0,5715	0,5730	0,5745	0,5760
15	0,5580	0,5595	0,5610	0,5625	0,5640	0,5655	0,5670	0,5685	0,5705	0,5720	0,5735
16	0,5555	0,5570	0,5585	0,5600	0,5615	0,5630	0,5645	0,5660	0,5675	0,5690	0,5710
17	0,5525	0,5540	0,5555	0,5575	0,5590	0,5605	0,5620	0,5635	0,5630	0,5665	0,5680
18	0,5500	0,5515	0,5530	0,5545	0,5560	0,5580	0,5595	0,5610	0,5625	0,5640	0,5655
19	0,5475	0,5490	0,5505	0,5520	0,5535	0,5550	0,5565	0,5580	0,5595	0,5610	0,5630
20	0,5445	0,5460	0,5475	0,5495	0,5510	0,5525	0,5540	0,5555	0,5570	0,5585	0,5600
21	0,5420	0,5435	0,5450	0,5465	0,5480	0,5495	0,5510	0,5525	0,5540	0,5555	0,5575
22	0,5395	0,5410	0,5425	0,5440	0,5455	0,5470	0,5485	0,5500	0,5515	0,5530	0,5545
23	0,5365	0,5380	0,5395	0,5410	0,5425	0,5440	0,5455	0,5470	0,5485	0,5500	0,5515
24	0,5335	0,5350	0,5365	0,5380	0,5400	0,5415	0,5430	0,5445	0,5460	0,5475	0,5490
25	0,5310	0,5325	0,5340	0,5355	0,5370	0,5385	0,5400	0,5415	0,5430	0,5445	0,5460
26	0,5260	0,5295	0,5310	0,5325	0,5340	0,5355	0,5370	0,5365	0,5400	0,5415	0,5430
27	0,5250	0,5265	0,5280	0,5295	0,5310	0,5325	0,5340	0,5355	0,5370	0,5385	0,5400
28	0,5220	0,5235	0,5250	0,5265	0,5280	0,5295	0,5310	0,5325	0,5340	0,5355	0,5370
29	0,5195	0,5210	0,5220	0,5235	0,5250	0,5265	0,5280	0,5295	0,5310	0,5325	0,5340
30	0,5160	0,5175	0,5190	0,5205	0,5220	0,5235	0,5250	0,5265	0,5280	0,5295	0,5310

Продолжение табл. 16

Продолжение табл. 16

Температура (в °C) \ Давление (в мм)	750	752	754	756	758	760	762	764	766	768	770
11	0,5855	0,5870	0,5885	0,5900	0,5915	0,5935	0,5950	0,5965	0,5980	0,5995	0,6010
12	0,5830	0,5845	0,5860	0,5875	0,5890	0,5905	0,5925	0,5940	0,5955	0,5970	0,5985
13	0,5805	0,5820	0,5835	0,5850	0,5865	0,5880	0,5895	0,5910	0,5930	0,5945	0,5960
14	0,5775	0,5790	0,5805	0,5825	0,5840	0,5855	0,5870	0,5885	0,5900	0,5915	0,5935
15	0,5750	0,5765	0,5765	0,5795	0,5810	0,5830	0,5845	0,5860	0,5875	0,5890	0,5905
16	0,5725	0,5740	0,5755	0,5770	0,5785	0,5800	0,5815	0,5830	0,5850	0,5865	0,5880
17	0,5695	0,5710	0,5730	0,5745	0,5760	0,5775	0,5790	0,5805	0,5820	0,5825	0,5850
18	0,5670	0,5685	0,5700	0,5715	0,5730	0,5745	0,5765	0,5780	0,5795	0,5810	0,5825
19	0,5645	0,5660	0,5675	0,5690	0,5705	0,5720	0,5735	0,5750	0,5765	0,5780	0,5795
20	0,5615	0,5630	0,5645	0,5660	0,5675	0,5690	0,5705	0,5725	0,5740	0,5755	0,5770
21	0,5590	0,5605	0,5620	0,5635	0,5650	0,5665	0,5680	0,5695	0,5710	0,5725	0,5740
22	0,5560	0,5575	0,5590	0,5605	0,5620	0,5635	0,5650	0,5665	0,5680	0,5695	0,5715
23	0,5530	0,5545	0,5560	0,5575	0,5595	0,5610	0,5625	0,5640	0,5655	0,5670	0,5685
24	0,5505	0,5520	0,5535	0,5550	0,5565	0,5580	0,5595	0,5610	0,5625	0,5640	0,5655
25	0,5475	0,5490	0,5505	0,5520	0,5535	0,5550	0,5565	0,5580	0,5595	0,5610	0,5625
26	0,5445	0,5460	0,5475	0,5490	0,5505	0,5520	0,5535	0,5550	0,5565	0,5580	0,5595
27	0,5415	0,5430	0,5445	0,5460	0,5475	0,5490	0,5505	0,5520	0,5535	0,5550	0,5565
28	0,5385	0,5400	0,5415	0,5430	0,5445	0,5460	0,5475	0,5490	0,5505	0,5520	0,5535
29	0,5355	0,5370	0,5385	0,5400	0,5415	0,5430	0,5415	0,5460	0,5475	0,5490	0,5505
30	0,5325	0,5340	0,5355	0,5370	0,5385	0,5400	0,5415	0,5430	0,5445	0,5460	0,5475

Открывают кран *H* и сливают в канализацию остатки жидкости в воронке *C* и промывают ее водой. После этого прибор готов для нового определения.

Прежде чем вычислять по найденному объему азота аминоазот взятой навески, необходимо сделать контрольный опыт, в котором вместо исследуемого раствора берут равный объем воды. Количество азота, выделяющееся в контрольном опыте, не должно быть больше 0,3—0,4 мл. Этот объем вычитают из найденного в основном опыте.

Пользуясь табл. 16, находят вес аминоазота в мг, отвечающий 1 мл газообразного азота, собранного при температуре и давлении опыта, и найденную величину умножают на объем азота, найденный в опыте. Деля на навеску в мг и умножая на 100, определяют аминоазот в процентах. Если определение велось для аминокислоты или полипептида, то теоретическое содержание аминоазота известно. Если же определялся аминоазот в растворе белка, то найденную величину относят к величине общего азота.

Точность газометрического определения —0,1 мл газообразного азота или 0,05 мг аминоазота.

Определяют аминоазот в растворах с известной концентрацией гликоколла, тирозина и аспарагина.

ОТДЕЛЬНЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Результаты исследований химического строения белковых веществ еще не позволяют в настоящее время построить такую классификацию этих соединений, которая была бы основана на тех или иных особенностях их структуры. Поэтому при всех попытках классификации белков, а также при характеристике каждого отдельного представителя этой группы веществ необходимо, привлекая, насколько это возможно, данные, касающиеся химического состава и свойств белкового вещества, пользоваться рядом других отличительных для него признаков. При характеристике белка, таким образом, имеют значение как аминокислотный состав, так и его растворимость, границы осаждения (высаливания), положение изоэлектрического пункта, отношение к ферментативным воздействиям, получение белка из той или иной ткани или органа и его физиологическая функция. На основе всех таких данных может быть построена следующая классификация белков, представляющая скорее общий обзор важнейших групп этих соединений.

I. ПРОТЕИНЫ

При полном гидролизе дают почти исключительно аминокислоты.

1. Протамины и гистоны. Отличаются высоким содержанием диаминокислот, отсутствием серусодержащих аминокислот и ограниченным числом аминокислот, входящих в их

состав. Белки основного характера с небольшим, сравнительно с другими белками, молекулярным весом. Они растворимы в воде и разбавленных кислотах и осаждаются из растворов при добавлении аммиака, щелочей или белков. К протаминам относятся белки, выделенные из спермы рыб (клупеин, сальмин, стурин и др.), где они находятся не в свободном виде, а в соединении с нуклеиновыми кислотами. Протамины, растворяясь в воде, дают щелочные растворы, не коагулирующие при нагревании; они содержат до 87% аргинина. Основной характер у протаминов более резко выражен, чем у гистонов. Гистоны содержат около 20—30% диаминокислот, обладают ясно выраженным основным характером и в клетках животных находятся в виде соединений с нуклеиновыми кислотами или пигментами (в составе нуклеопротеидов и хромопротеидов).

2. Альбумины. В состав альбуминов входит большое число аминокислот. Аминокислотный состав характеризуется очень низким содержанием или полным отсутствием глицина и сравнительно высоким содержанием цистина и метионина. Растворимы в воде и осаждаются из растворов при нейтральной реакции лишь при полном насыщении сернокислым аммонием. Белки преимущественно животного происхождения. К альбуминам относятся: лактальбумин, овальбумин, серумальбумин, миоальбумин и миоген.

3. Глобулины. Близки по аминокислотному составу к альбуминам. Отличаются от альбуминов содержанием глицина и нерастворимостью в воде. Растворимы в разбавленных растворах солей. Коагулируют из нейтральных растворов легче, чем альбумины — уже при полунасыщении сернокислым аммонием или при полном насыщении хлористым натрием. Ввиду своей нерастворимости в воде, осаждаются из растворов при диализе. Встречаются одинаково широко как в животных, так и в растительных организмах. К растительным глобулинам относятся эдестин (конопля), туберин (картофель), эксцельсин, глицинин, легумин, фермент уреаза и другие; к животным глобулинам — фибриноген (плазма крови), глобулин *x* и миозин (мускулы), лактоглобулин, серумглобулин, гепатоглобулин, а также некоторые белки с действием ферментов и гормонов: пепсин, трипсин, фосфорилаза мускулов, тиреоглобулин (гормон щитовидной железы), пролактин и тиротропин (гормоны гипофиза) и другие.

4. Проламины (глиадины) и глютелины. Глютелины и проламины — растительные белки, нерастворимые в воде и растворимые в сильно разбавленных кислотах и щелочах. Проламины растворимы, кроме того, в 70—80%-ном алкоголе. Отличаются высоким содержанием пролина или глутаминовой кислоты. К проламинам относятся глиадин, горденин, секалин, папаин и другие растительные белки.

5. Склеропротеины (альбуминоиды). Эта группа фибриллярных белков, играющих в организме животных

роль опорных и покровных веществ. Белки эти нерастворимы и весьма устойчивы к химическим и ферментативным воздействиям. Кроме своей стойкости и нерастворимости эта группа белков характеризуется отсутствием некоторых аминокислот и, наряду с этим, очень высоким содержанием какой-либо отдельной аминокислоты (например, глицина в коллагене и фиброине, цистина в кератине). Сюда относятся коллаген, эластин, ретикулин, кератины, нейрокератин, фиброин шелка, конхиолин и спонгин.

6. Фосфопротеины. Белки кислого характера, содержащие эфирносвязанную с остатком серина фосфорную кислоту. Фосфорная кислота отщепляется при нагревании в щелочных растворах. Содержание фосфора 0,5—0,9%. Фосфопротеины нерастворимы в воде, но растворимы в разбавленных щелочах. Осаждаются при полунасыщении сернокислым аммонием. К фосфопротеинам относятся казеин молока и вителлин яичного желтка.

II. ПРОТЕИДЫ

Состоят из двух компонентов: собственно белкового вещества и вещества небелкового характера, так называемой простетической группы. Простетическая группа протеидов в большинстве случаев сравнительно легко может быть отщеплена от белковой части молекулы. Некоторые из этих соединений по своему характеру сходны с солями.

1. Нуклеопротеиды. Соединения нуклеиновых кислот (полинуклеотидов) с белками преимущественно основного характера (гистоны, протамины), содержат 3—6% фосфора, нерастворимы в воде и разбавленной уксусной кислоте, растворимы в разбавленных щелочах. Нуклеиновая кислота отщепляется при действии кислот и щелочей. К нуклеопротеидам, содержащим нуклеиновые кислоты, относятся нуклеопротеиды зобной железы и дрожжей, и вирусы.

2. Ферменты-протеиды, содержащие в качестве простетической группы динуклеотиды, фосфорный эфир рибофлавина, пирофосфорный эфир тиамина и родственные им соединения. Сюда относятся: дегидразы, содержащие ди- и трифосфопиридиннуклеотиды (кодегидразы I и II), карбоксилазы, содержащие тиаминпирофосфат и флавопротеиды, к которым принадлежат: «желтые ферменты», простетической группой которых является рибофлавинфосфат, ксантиноксидаза, содержащая в качестве простетической группы изоаллоксазин-аденин-динуклеотид, глициноксидаза и оксидазы *l*-аминокислот.

3. Глюкопротеиды. Белки, содержащие остаток полисахарида, гиалуроновой кислоты или эфиров серной кислоты и полиуронидов. Растворимы в воде или разбавленных щелочах. Углеводный компонент отщепляется при кипячении с щелочами. Сюда относятся: муцины, мукоиды, сульфомуцины, хондромукоиды, тромбин.

4. Липопротеиды. Соединения белков с фосфатидами и стеридами. Липоидный компонент отщепляется действием алкоголя, желчных солей или растворов мочевины. Свойства различны в зависимости от свойств белкового компонента. Сюда относятся: эвглобулин сыворотки крови, лецитовителлин яичного желтка, тромбопластин.

5. Хромопротеиды. Протеиды, содержащие, наряду с белковым компонентом, окрашенное соединение (пигмент). Простетическая группа отщепляется при нагревании с щелочами или кислотами. К этой группе относятся красные дыхательные пигменты эритроцитов позвоночных животных, представляющие соединения гема с белками типа гистонов — глобинами. Гемоглобины растворимы в воде и осаждаются или при полном насыщении или при полунасыщении сернокислым аммонием. Далее к этой же группе относятся другие желто- и красно-окрашенные геминовые соединения с белками, такие, как миоглобин (миохром) поперечнополосатых мышц, эритрокруорины беспозвоночных, каталаза и пероксидазы, цитохром С. Некоторые хромопротеиды представляют собою не содержащие железа или меди соединения желчных пигментов с белком. Кроме того, к хромопротеидам могут быть отнесены и окрашенные соединения белков с каротиноидами.

6. Металлопротеиды. Протеиды, содержащие в качестве простетической группы Cu, Fe, Zn. Сюда относятся такие ферменты, как фенолоксидазы (тирозиназы), и такие дыхательные пигменты беспозвоночных, как гемоцианины, представляющие собою Cu-протеиды. Инсулин — гормон поджелудочной железы, по многим свойствам сходный с альбуминами, но резко отличающийся от них по своей растворимости в водном алкоголе, содержит Zn и также может быть отнесен к этой группе белков.

Истинная специфичность структуры различных белков значительно тоньше, чем это можно заключить на основании приведенной схематической классификации. Белки, как антигены, вызывают в условиях биологического опыта образование антител, строго специфичных по отношению только к данному белку. Однако, специфичность, обнаруживаемая иммунными реакциями и имеющая в своей основе химическое строение белковой молекулы, не находит еще достаточно строгого структурно-химического выражения.

Работа 116. **Яичный альбумин (овальбумин).**

Яичный белок смешивают с пятикратным объемом воды и выпавший яичный глобулин отфильтровывают. В полученном фильтрате открывают наличие альбумина осаждением путем нагревания и алкалоидными реактивами, а затем, для подтверждения альбуминового характера обнаруженного белка, определяют границы высаливания. Для этого в девять пробирок наливают в каждую по 1 мл раствора белка. После этого доливают различное

количество воды так, как это указано на нижеследующей таблице, а затем в первые восемь пробирок наливают возрастающий объем насыщенного раствора сернокислого аммония, а в девятую добавляют твердой соли [$(NH_4)_2SO_4$], до полного насыщения.

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Раствор белка (в мл)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Воды (в мл.)	7,0	6,0	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0	0,0	9,0
Насыщенный раствор $(NH_4)_2SO_4$ (в мл) . .	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	Твердая соль
Процент от полного насыщения	20	30	40	50	60	70	80	90	100

Пробирка, дающая заметную муть при минимальной (сравнительно с другими пробирками) концентрации сернокислого аммония, определяет нижнюю границу высаливания. Если, например, помутнение (выпадение белка в осадок) происходит, начиная с пятой пробирки, то нижняя граница высаливания — 60% от полного насыщения сернокислым аммонием.

После некоторого стояния выпавшие осадки белка отфильтровывают и к фильтратам добавляют твердый сернокислый аммоний до насыщения. Пробирка с минимальной концентрацией сернокислого аммония (см. таблицу), в которой жидкость не дает при этом помутнения, определяет верхнюю границу высаливания белка.

Если желают более точно определить границы высаливания белка, берут большее число различных концентраций сернокислого аммония.

Работа 117. **Сывороточный альбумин (серумальбумин)**

Оксалатную кровь, т. е. кровь, стабилизированную добавлением щавелевокислого калия (удаление ионов кальция), центрифугируют и отделяют плазму от форменных элементов. К 30 мл полученной плазмы добавляют 20 мл воды, затем 50 мл насыщенного раствора сернокислого аммония. Выпавший осадок, состоящий из фибриногена и сывороточного глобулина, отфильтровывают и фильтрат насыщают добавлением твердого сернокислого аммония. Образовавшийся осадок альбумина отфильтровывают и растворяют, добавляя к осадку воду. Отделяют на центрифуге прозрачный раствор альбумина и с этим раствором делают реакции осаждения и цветные реакции.

Работа 118. **Миозин (мышечный глобулин)**

Миозин—белок, с изоэлектрическим пунктом при pH =5,5,— главная составная часть сократительной структуры мышечного волокна. Как показали работы лауреатов Сталинской премии Энгельгардта и Любимовой, миозин обладает ферментативным действием: он ускоряет реакцию гидролитического расщепления АТФ в АДФ. Для его получения из мышцы предварительно удаляют другие, растворимые в воде и в очень разбавленных солевых растворах, белки.

Хорошо измельченную мышечную ткань извлекают при перемешивании около 30 минут четырехкратным объемом воды. Остаток отделяют центрифугированием, жидкость сливают. При этом в раствор переходят миоген, миоальбумин, глобулин *x* и бо́льшая часть миоглобина (миохрома).

Остаток ткани извлекают в течение одного часа при постоянном встряхивании (на машине) тремя объемами 4%-ного раствора хлористого калия, 5%-ного раствора сернокислого магния или 5—10%-ного раствора хлористого аммония. Жидкость отделяют от остатков ткани фильтрованием через несколько слоев марли и помещают во внутренний цилиндр диализатора. После 12-часового диализа сливают жидкость с выпавшего осадка глобулина, смешивают осадок с небольшим количеством воды и центрифугируют. Сливают жидкость с осадка, прибавляют 4%-ный раствор хлористого калия и встряхивают. При этом большая часть глобулина переходит в раствор, который отделяют на центрифуге от нерастворившейся части. С полученным раствором мышечного глобулина делают реакции осаждения и цветные реакции, а затем, для подтверждения глобулинового характера полученного белка, определяют границы высаливания. Для этого в двенадцать пробирок наливают в каждую по 2 мл раствора белка. После этого наливают в пробирки уменьшающиеся объемы воды, как это указано в нижеследующей таблице, и затем возрастающие объемы насыщенного раствора сернокислого аммония.

Пробирка с минимальной концентрацией сернокислого аммония, дающая заметное осаждение белка, определяет нижнюю

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Раствор белка (в мл)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Воды (в мл)	7,5	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,0	1,0
Насыщенный раствор $(NH_4)_2SO_4$ (в мл) .	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6,0	7,0
Процент от полного насыщения	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	60	70

границу высаливания. Если, например, осадок белка образовался, начиная с третьей пробирки, то нижняя граница высаливания —15% от полного насыщения сернокислым аммонием.

После некоторого стояния выпавшие осадки отфильтровывают и к фильтратам добавляют по 3 мл насыщенного раствора сернокислого аммония. Пробирка с минимальной концентрацией сернокислого аммония, в которой при этом не образуется осадка и жидкость остается прозрачной, определяет верхнюю границу высаливания белка. Так, например, если первая из пробирок, в которых жидкость осталась прозрачной, одиннадцатая, то верхняя граница высаливания —60% от полного насыщения сернокислым аммонием.

Работа 119. **Коллаген**

Измельченные сухожилия настаивают несколько часов с водой для удаления растворимых в воде белков. Затем извлекают в течение суток полунасыщенным раствором гидрата окиси кальция для удаления глюкопротеида — тендомукоида. После этого тщательно промывают в проточной воде до исчезновения щелочной реакции в промывных водах. Затем сухожилия нагревают с водой в фарфоровой чашке в течение нескольких часов при постоянном кипении жидкости. Время от времени доливают воду взамен испарившейся. При извлечении горячей водой нерастворимый коллаген, подвергаясь очень неглубокому гидролизу, превращается в желатину (глутин), которая переходит в раствор. Сливают раствор, который по охлаждении желатинирует. Этот раствор несколько разбавляют водой и делают реакции осаждения и цветные реакции на белки. В противоположность альбуминам и глобулинам желатина не дает реакций на триптофан и тирозин и лишь слабую — на цистин.

Органическую часть кости, оставшуюся после удаления минеральных веществ (см. работу 4), хорошо отмывают водой от кислоты до почти полного исчезновения реакции на Cl' и извлекают горячей водой, как это указано для сухожилий. Исследуют полученный раствор желатины.

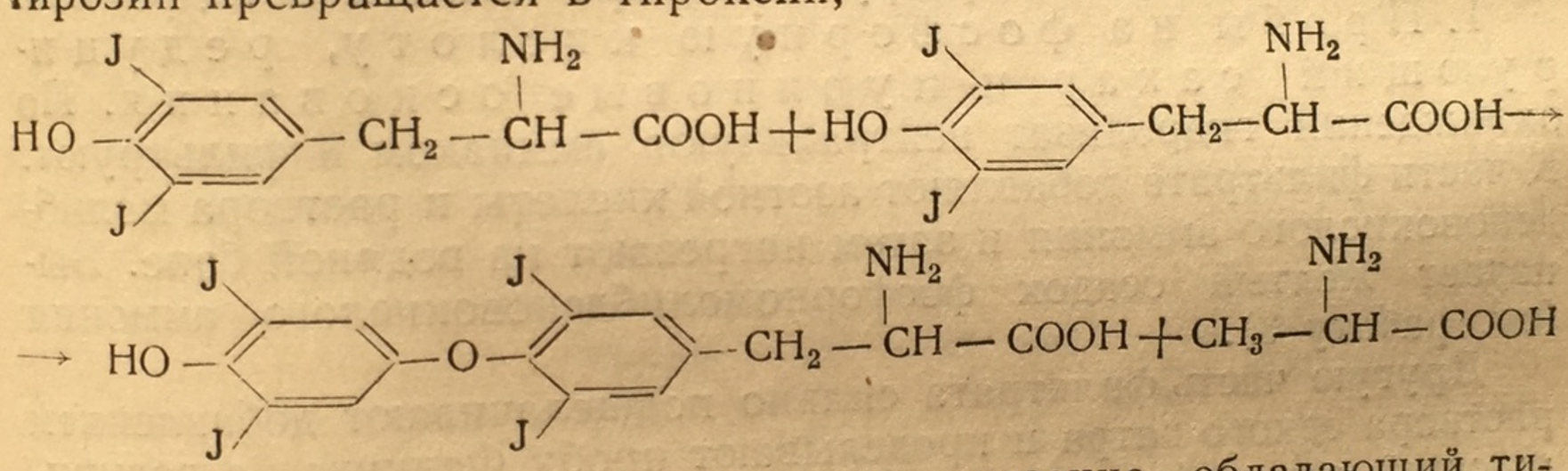
Работа 120. **Казеин**

Дают молоку отстояться и тщательно снимают верхний слой (жир). Снятое молоко разбавляют двумя объемами воды и затем при помешивании по каплям осторожно добавляют 0,1—0,5%-ную уксусную кислоту до прекращения выделения осадка белка. Следует избегать значительного избытка уксусной кислоты. Осадок казеина отсасывают, промывают два-три раза водой и затем спиртом, отжимают на воронке под вакуумом и высушивают на воздухе. В кислом фильтрате (молочная сыворотка) находятся молочный глобулин и альбумин. Их осаждают насыщением фильтрата сернокислым аммонием или кипячением раствора после подкисления. С полученным осадком делают цветные реакции на белки.

Высушенный казеин для освобождения от небольшого количества увлеченного жира экстрагируют на холоду эфиром. Эфир сливают, осадок отжимают и высушивают на воздухе. Полученный чистый казеин обладает ясно кислым характером. Пробуют его растворимость в разбавленных растворах едких щелочей и растворе соды. С раствором казеина в растворе соды делают реакции осаждения и цветные реакции.

Иодирование казеина. 10 г казеина растворяют в 350 мл 5%-ного аммиака и добавляют раствор 3 г иода и 6 г иодистого калия в 100 мл воды. Смесь оставляют на час, затем подкисляют. Выпавший иодированный казеин отделяют и многократно промывают водой или диализируют до исчезновения реакции на иодиды. Отмытый осадок отсасывают и высушивают. В полученном продукте определяют органически связанный иод по способу, описанному в работе 5.

При иодировании казеина тирозин иодируется до моно- и дииодтирозина. Если реакция ведется с достаточным количеством иода, при достаточно высоком pH и при температуре 40—70°, то дииодтирозин превращается в тироксин,



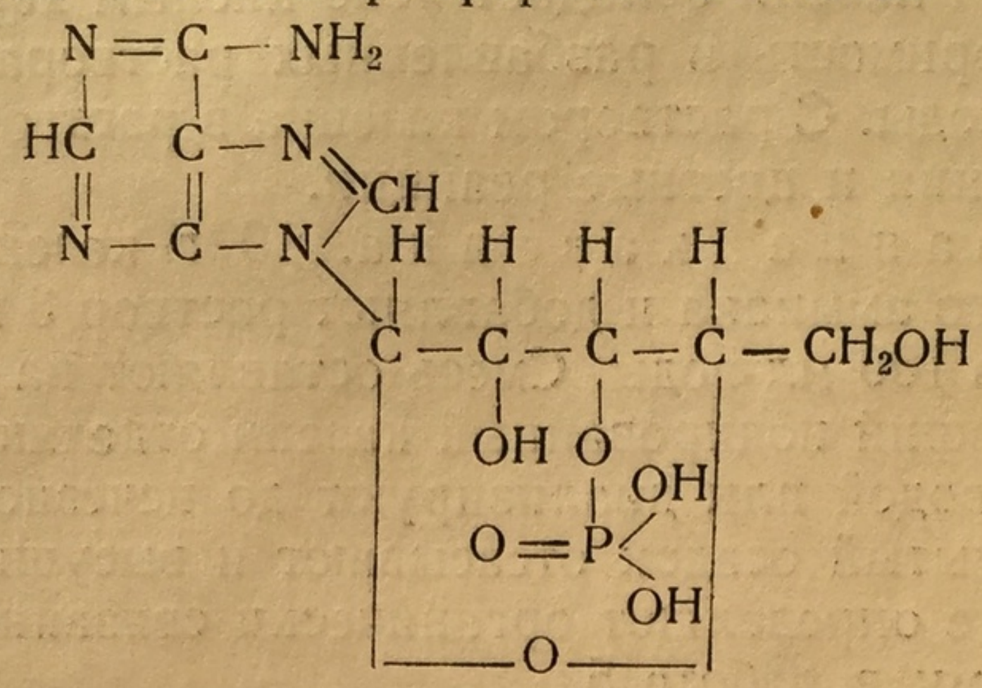
и получается препарат иодированного казеина, обладающий тиреоидной активностью (активностью гормона щитовидной железы).

Работа 121. **Нуклеопротеид дрожжей**

Прессованные дрожжи тщательно растирают с чистым песком, добавив несколько миллилитров эфира и воды. Растертые дрожжи заливают трехкратным (к весу дрожжей) объемом 0,4%-ного раствора едкого натра, добавляют 1—2 мл толуола и оставляют на сутки. После этого щелочной экстракт, содержащий нуклеопротеид, отфильтровывают через большой складчатый фильтр и из фильтрата осаждают нуклеопротеид осторожным добавлением 5%-ной серной кислоты до прекращения выделения осадка. Осадок нуклеопротеида отделяют центрифугированием, смешивают с небольшим количеством воды и снова отделяют. С полученным нуклеопротеидом делают цветные реакции на белки, а затем подвергают часть его гидролизу, для чего в течение двух часов нагревают при кипении с 10—20-кратным обемом 5%-ной серной кислоты в небольшой колбе с обратным холодильником.

При этом происходит не только отщепление нуклеиновой кислоты, но и дальнейший ее гидролиз вначале до мононуклеоти-

дов, среди которых образуется дрожжевая адениловая кислота или *h*-адениловая кислота (9-аденил-3-фосфорибозид), отличающаяся от адениловой кислоты мускулов (9-аденил-5-фосфорибозид) положением остатка фосфорной кислоты:



Затем мононуклеотиды гидролизуются с отщеплением фосфорной кислоты в нуклеозиды и, наконец, последние расщепляются, образуя пуриновые и пиримидиновые основания и *d*-рибозу или глюкозу. Дезоксирибоза разрушается при кислотном гидролизе.

1. Пробы на фосфорную кислоту, редуцирующий сахар и пуриновые основания. По охлаждении гидролизат нейтрализуют аммиаком и фильтруют. К части фильтрата добавляют азотной кислоты и раствора молибденовокислого аммония и затем нагревают на водяной бане. Выпадает желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония (см. работу 3).

Другую часть фильтрата сильно подщелачивают добавлением раствора едкого натра и проделывают пробу Фелинга на редуцирующий сахар (см. работу 45).

К оставшейся части фильтрата добавляют 5 мл аммиачного раствора азотнокислого серебра. При этом выпадает осадок серебряных соединений аденина и гуанина.

2. Пробы на пентозу и на дезоксисахар. К небольшому количеству нуклеотида добавляют равный объем концентрированной соляной кислоты и нагревают до кипения, прикрыв отверстие пробирки куском сухой, смоченной ацетатом анилина, бумаги. Выделяющийся фурфурол окрашивает бумагу в розовый или красный цвет.

Небольшое количество нуклеопротеида (лучше чистой нуклеиновой кислоты) смешивают с 4 мл ледяной уксусной кислоты и коротко нагревают. Затем постепенно добавляют 10—15 капель концентрированной серной кислоты, содержащей 0,01% закисного сернокислого железа. При наличии дезоксисахара после осторожного нагревания образуется зелено-синее до пурпурно-синего окрашивание.

Различие в строении нуклеиновых кислот из дрожжей и из зобной железы ясно при сопоставлении следующих вероятных структурных формул:

Аденин — CH — CH (OH) — CH — CH — CH_2OH

Цитидин — CH — CH — CH — CH — CH_2OH

Гуанин — CH — CH — CH — CH — CH_2OH

Уридин — CH — CH — CH — CH — CH_2OH

Нуклеиновая кислота дрожжей

Аденин — CH — CH_2 — CH (OH) — CH — CH_2 — O — P = O

Цитидин — CH — CH_2 — CH — CH — CH_2 — O — P = O

Гуанин — CH — CH_2 — CH — CH — CH_2 — O — P = O

Тимин — CH — CH_2 — CH — CH — CH_2 — O — P = O

Нуклеиновая кислота зобной железы

Работа 122. Гемоглобин

Гемоглобин (HHb) — окрашенный в красный цвет дыхательный протеид, входящий в состав эритроцитов крови позвоночных животных, представляет собою, как это впервые обнаружил в 1898 г. Д. Лавров, соединение белка глобина (с изоэлектрическим пунктом при pH=7,5) и окрашенного, содержащего двухвалентное железо, гема. Молекулярный вес гемоглобина 69 000, а содержание в нем железа 0,33%, откуда очевидно, что на одну молекулу глобина приходится четыре молекулы гема.

Гемоглобины крови различных позвоночных животных различны. Это различие относится за счет глобиновой части молекулы, так как гем в различных гемоглобинах один и тот же, как это было установлено М. Ненцким. Гем представляет собою соединение Fe^{++} с протопорфирином (1,3,5,8-тетраметил-2,4-дивинил-6,7-дикарбоксиэтил-порфином), причем атом железа принимает участие в образовании связи молекулы гема с молекулой глобина.

Гемоглобин чрезвычайно легко образует непрочное и легко диссоциирующее соединение с молекулярным кислородом — оксигемоглобин ($HHbO_2$). При таком присоединении не происходит изменения валентности Fe^{++} гема. Оксигемоглобин образуется настолько легко, что в присутствии воздуха гемоглобин практически весь превращается в оксигемоглобин. С другой стороны, оксигемоглобин не только в присутствии восстановителей, поглощающих кислород, но уже в вакууме при пропускании тока индиферентного газа превращается в гемоглобин. Гемоглобин — очень слабая кислота с $K_{37^\circ}=7{,}5\cdot10^{-9}$. Кислотные свойства повышаются при превращении в оксигемоглобин, у которого $K_{37^\circ}=5\cdot10^{-7}$.

Гемоглобин дает соединения и с другими газами (CO, HCN, H_2S). С окисью углерода он образует карбоксигемоглобин (HHbCO), соединение более прочное, чем оксигемоглобин. Сродство гемоглобинов различных животных к CO различно. Реакция превращения $HHbO_2$ в HHbCO обратима:

$$HHbO_2 + CO \rightleftarrows HHbCO + O_2.$$

Гемоглобин дает непрочное соединение и с CO_2:

$$(HHb)\,NH_2 + CO_2 \rightleftarrows (HHb)\,NHCOOH.$$

которое играет известную роль в переносе угольной кислоты кровью.

При действии на оксигемоглобин окислителей образуется метгемоглобин (MHb). При этом происходит окисление двухвалентного железа гема в трехвалентное и метгемоглобин уже теряет способность участвовать в переносе кислорода. Образование метгемоглобина может наблюдаться и in vivo, например, при отравлении $KClO_3$, нитросоединениями, пирогаллолом и другими соеди-

нениями. Компонентами метгемоглобина являются белок глобин и пигмент гематин, отличающийся от гема тем, что содержит Fe^{+++}.

Гемоглобин, оксигемоглобин, карбоксигемоглобин и метгемоглобин могут быть качественно охарактеризованы присущими им спектрами поглощения.

1. Оксигемоглобин ($HHbO_2$). Готовят в четырех пробирках разведенную водой в 30, 60, 120 и 240 раз дефибринированную кровь и исследуют растворы в спектроскопе. При одном из этих разведений совершенно отчетливо виден спектр поглощения оксигемоглобина — две полосы поглощения в желтом и зеленом цвете при 578,1 mμ и 541,7 mμ, между линиями *D* и *E*.

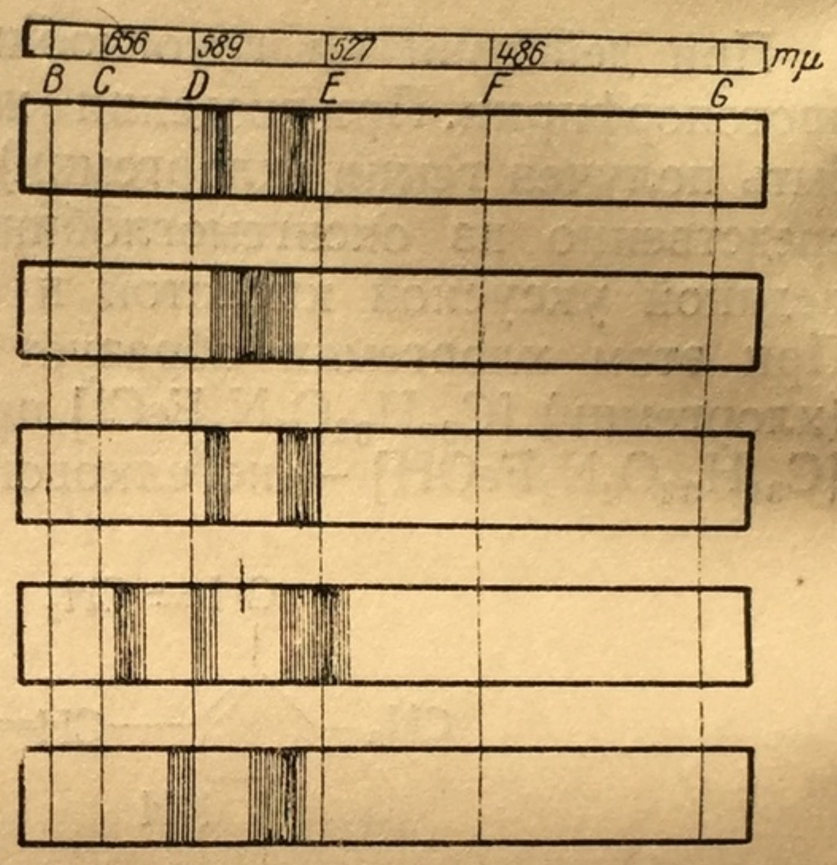


Рис. 17. Спектры оксигемоглобина, гемоглобина, карбоксигемоглобина и гематопорфирина.

2. Гемоглобин (HHb). К раствору крови, который дал в предыдущем опыте ясно видимую картину спектра оксигемоглобина, прибавляют несколько капель реактива, содержащего 2г $FeSO_4$ и 3 г винной кислоты в 100 мл воды. Происходит восстановление оксигемоглобина в гемоглобин и в спектроскопе видна характерная для гемоглобина одна широкая полоса поглощения (максимум при 555—558 mμ) между линия *D* и *E*. Полученный раствор гемоглобина встряхивают для того, чтобы смешать с воздухом, и затем наблюдают в спектроскопе. Спектр гемоглобина переходит снова в спектр оксигемоглобина, т. е. появляются две полосы поглощения.

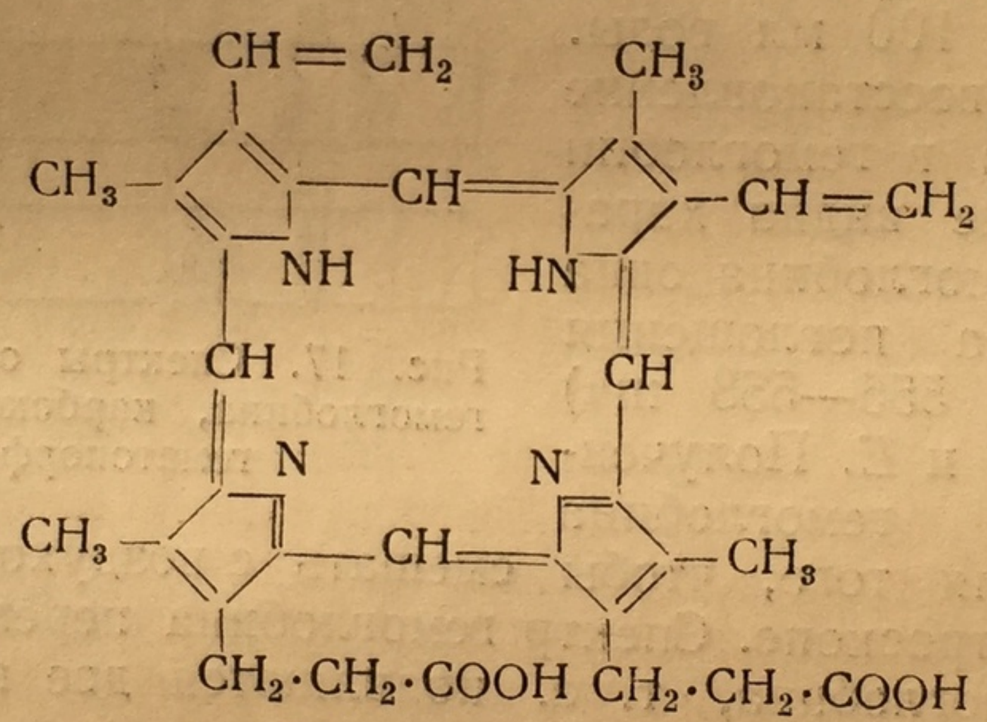
3. Метгемоглобин (MHb). К дефибринированной крови, разведенной в 30 раз, добавляют несколько капель свежеприготовленного концентрированного раствора красной кровяной соли $[K_3Fe(CN)_6]$ и перемешивают жидкость. При исследовании в спектроскопе виден спектр метгемоглобина — три полосы поглощения: две между линиями *D* и *E* и одна, наиболее резкая, при 630 mμ, между *C* и *D*. Добавляют к раствору метгемоглобина несколько капель раствора сернистого аммония. При этом образуется гемоглобин и в спектроскопе видна одна широкая полоса поглощения между *D* и *E*.

4. Карбоксигемоглобин (HHbCO). Насыщают кровь светильным газом, который всегда содержит окись углерода. Кровь при этом приобретает яркорозовый цвет. Ее разбавляют в 30 раз водой и наблюдают в спектроскопе спектр карбоксигемоглобина — две полосы поглощения при 572 mμ — 537 mμ между линиями *D* и *E*. Этот спектр поглощения очень сходен со спектром

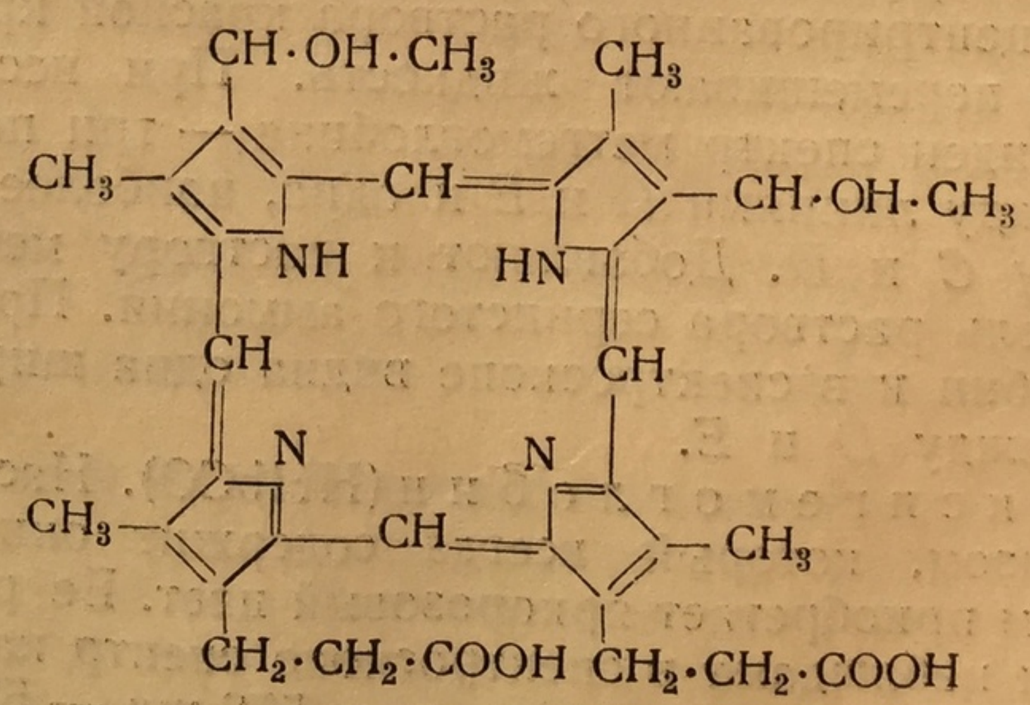
поглощения оксигемоглобина. Для того, чтобы отличить спектр $HHbCO$ от спектра $HHbO_2$, к раствору карбоксигемоглобина прибавляют несколько капель реактива, содержащего 2 г $FeSO_4$ и 3 г винной кислоты в 100 мл воды. При этом, в противоположность $HHbO_2$, не происходит никакого изменения спектра, так как карбоксигемоглобин не переходит при действии реактива в гемоглобин.

А. ПРОДУКТЫ РАСЩЕПЛЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНА

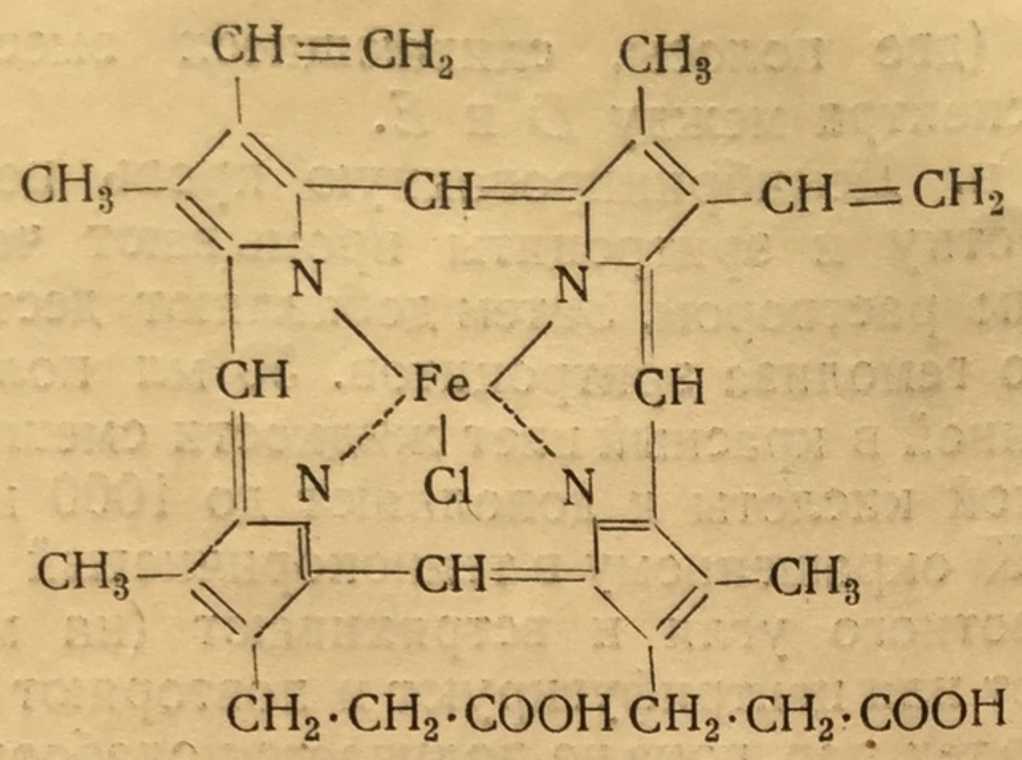
При действии на гемоглобин соляной кислоты отщепляется протопорфирин. При введении железа в протопорфирин может быть получен гемин (хлоргемин). Хлоргемин получается и непосредственно из оксигемоглобина при нагревании последнего с ледяной уксусной кислотой и кристаллами хлористого натрия. При этом хлоргемин образует характерные кристаллы. Гемин (хлоргемин) $[C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl]$ представляет собою соль гематина $[C_{34}H_{32}O_4N_4FeOH]$ — небелкового компонента метгемоглобина.



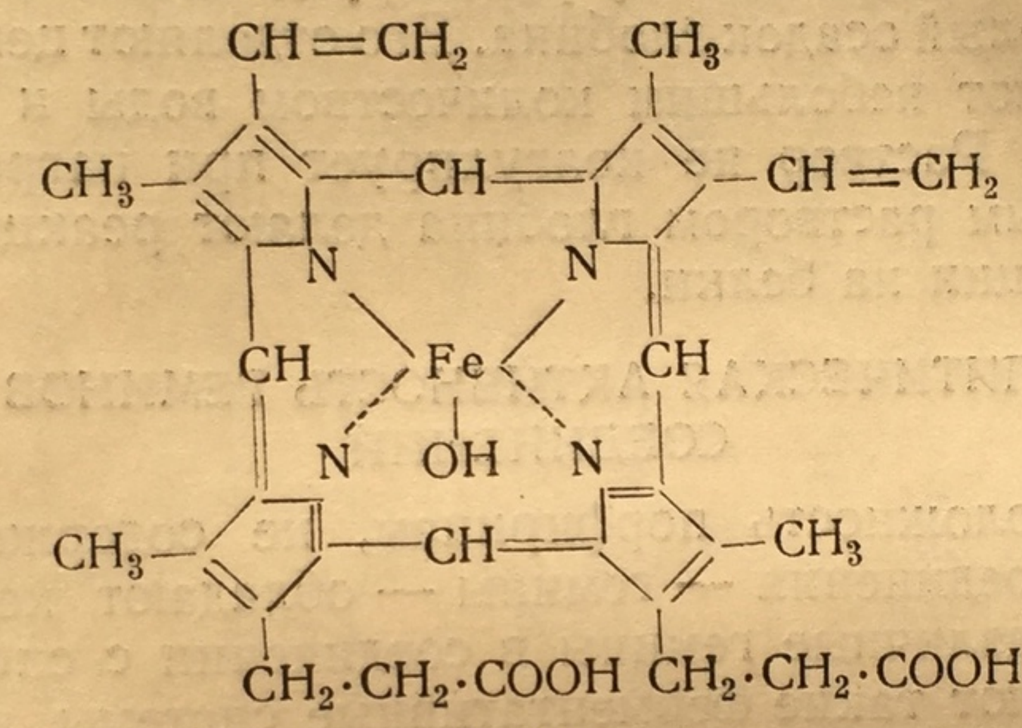
Протопорфирин



Гематопорфирин



Гемин (хлоргемин)



Гематин

При действии концентрированной серной кислоты на гемоглобин и оксигемоглобин не только происходит отщепление протопорфирина, но образовавшийся протопорфирин тотчас присоединяет по месту двойных связей своих винильных групп две молекулы воды и превращается в гематопорфирин. Обратно, протопорфирин может быть получен из гематопорфирина при отнятии от последнего двух молекул воды.

1. Гемин (хлоргемин). Очень характерные кристаллы гемина — темнобурые в проходящем свете ромбоидальные таблички, часто образующие звездообразные сростки,— получают следующим образом. Каплю крови осторожно высушивают на предметном стекле и нагревают на небольшом пламени с кристаллом хлористого натрия и 1—2 каплями ледяной уксусной кислоты. По охлаждении рассматривают образовавшиеся кристаллы под микроскопом.

2. Гематопорфирин. К 5 мл концентрированной серной кислоты прибавляют несколько капель дефибринированной крови. Жидкость приобретает интенсивную винно-красную окраску. При исследовании жидкости в спектроскопе (если поглощение света в спектроскопе слишком интенсивно, жидкость разводят ледяной уксусной кислотой) виден спектр гематопорфирина — две полосы поглощения: узкая — в оранжевом цвете около линии

D и широкая (две полосы, сливающиеся вместе) — в желто-зеленой части спектра между *D* и *E*.

3. Глобин. Дефибринированную кровь центрифугируют, удаляют сыворотку и эритроциты промывают четыре-пять раз физиологическим раствором. Затем добавляют дестиллированную воду до полного гемолиза эритроцитов. 50 мл полученной прозрачной окрашенной в красный цвет жидкости смешивают с 100 мл ледяной уксусной кислоты и дополняют до 1000 мл дестиллированной водой. К окрашенному в темнокоричневый цвет раствору добавляют животного угля и встряхивают (на машине) около часа. Фильтруют или центрифугируют и повторяют обработку животным углем до тех пор, пока не получается слабоокрашенный раствор. К почти обесцвеченному раствору добавляют аммиака, причем выпадает белый осадок глобина. Его отделяют центрифугированием, промывают небольшим количеством воды и растворяют в 0,1 н. кислоте. Раствор не коагулирует при нагревании.

С полученным раствором глобина делают реакции осаждения и цветные реакции на белки.

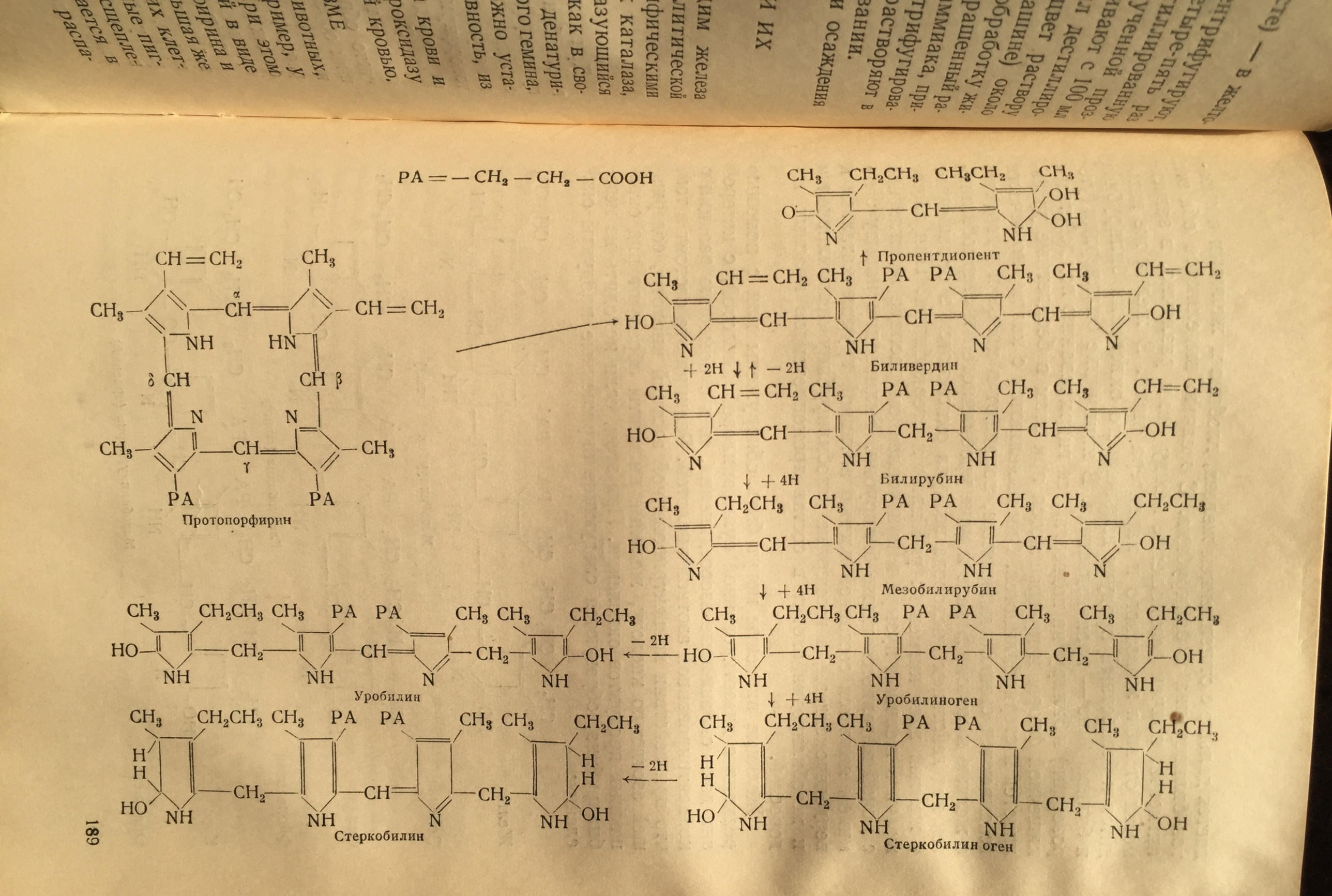
В. КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕМИНОВ И ИХ СОЕДИНЕНИЙ

В противоположность порфиринам, не содержащим железа их железные соединения — гемины — обладают каталитической активностью. Различные гемины в соединении с специфическими белками образуют такие ферментативные системы как каталаза, пероксидазы, цитохромы, цитохромоксидаза. Гемин, образующийся при расщеплении оксигемоглобина, также обладает как в свободном состоянии, так и в соединении с нативными и денатурированными белками каталитическим действием. Для этого гемина, гемоглобина и продуктов денатурации последнего можно установить оксидазную, каталазную и пероксидазную активность, из которых последняя наиболее резко выражена.

Для обнаружения пероксидазного действия гемина крови и его соединений проделывают гваяковую пробу на пероксидазу (см. работу 37) с свежей, прокипяченной и высушенной кровью.

С. ПРОДУКТЫ РАСПАДА ГЕМОГЛОБИНА В ОРГАНИЗМЕ

Гемоглобин, входящий в состав эритроцитов крови животных, непрерывно разрушается и синтезируется, так что, например, у человека за 75—140 дней полностью обновляется. При этом частью происходит отщепление протопорфирина, который в виде продуктов дальнейшего своего превращения — копропорфирина и уропорфирина — выделяется с желчью, калом и мочой. Большая же часть гемоглобина подвергается в клетках печени и других клетках ретикулоэндотелия распаду в так называемые желчные пигменты. При таком распаде происходит окислительное расщепление порфиринового цикла, причем гемоглобин превращается в вердогемоглобин или холегемоглобин, а этот последний распа-

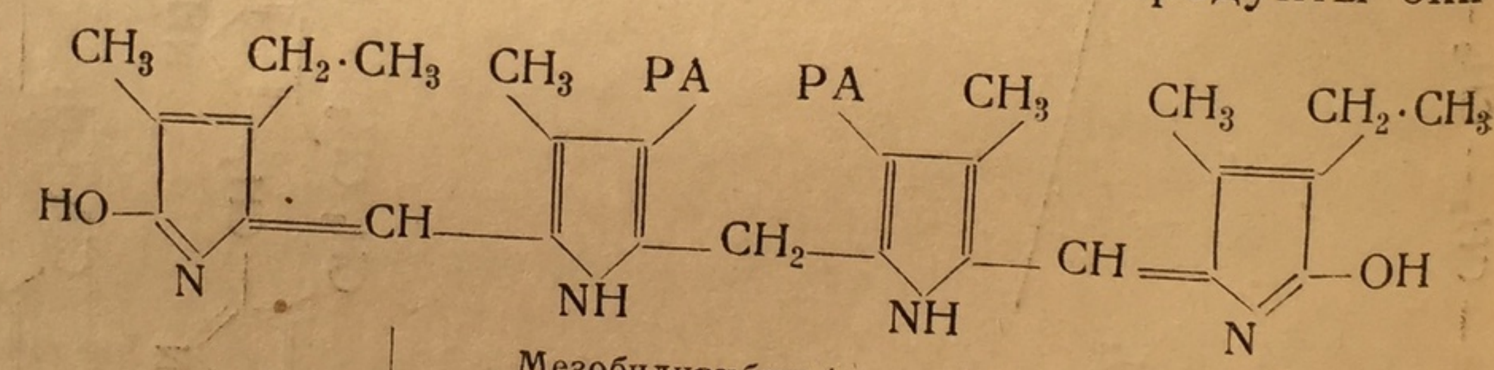

PA = — CH2 — CH2 — COOH
Протопорфирин
Пропентдиопент
Биливердин
Билирубин
Мезобилирубин
Уробилиноген
Уробилин
Стеркобилин оген
Стеркобилин
+ 2H ↓↑ − 2H
↓ + 4H
− 2H

дается дальше с отщеплением железа, глобина и желчных пигментов биливердина и билирубина. С желчью выделяются оба эти пигмента, причем соотношение между ними различно, в зависимости от вида животного и характера пищи. В желчи же находится и бесцветный продукт дальнейшего окисления билирубина и биливердина — пропентдиопент. В кишечнике биливердин (уторовердин) и билирубин подвергаются гидрированию под действием кишечной флоры и превращаются при этом в бесцветные уробилиноген и стеркобилиноген. Они выделяются с калом, но отчасти всасываются стенкой кишечника, попадают в кровь и выводятся с желчью и мочой. В кале и моче уробилиноген и стеркобилиноген под действием кислорода воздуха окисляются в окрашенные в желтый цвет пигменты: уробилин и стеркобилин. При застое желчи в желчном пузыре и при усиленном распаде гемоглобина с мочой выделяется также билирубин. Биливердин наряду с гемином является составной частью активной группы каталазы и вердопероксидазы, а изомерные мезобилирубину мезобиливиолин и мезобилиродин входят в состав хромопротеидов красных водорослей.

Желчные пигменты могут быть обнаружены или с помощью реакции с диазотированной сульфаниловой кислотой, с которой они дают окрашенные азосоединения, или с помощью реакции с концентрированной азотной кислотой. Реакция эта состоит в том, что при действии концентрированной азотной кислоты, содержащей азотистую кислоту, желчные пигменты образуют ряд окрашенных продуктов окисления. При этом, если исходить из мезобилирубина, образуются следующие окрашенные продукты окисления:

Желтая

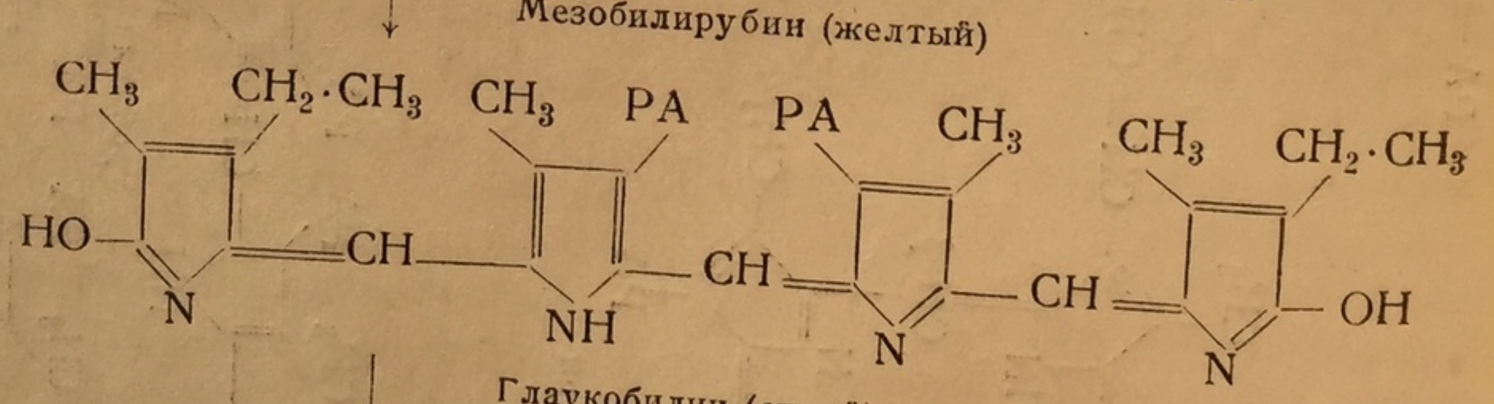
Зеленая



Мезобилирубин (желтый)

Синяя

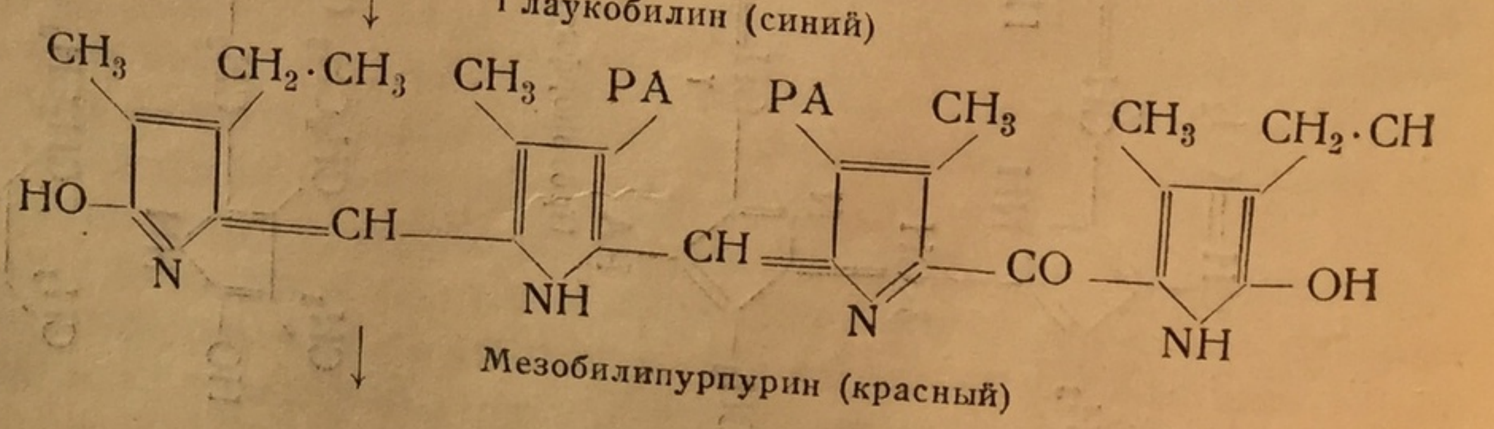
Фиолетовая



Глаукобилин (синий)

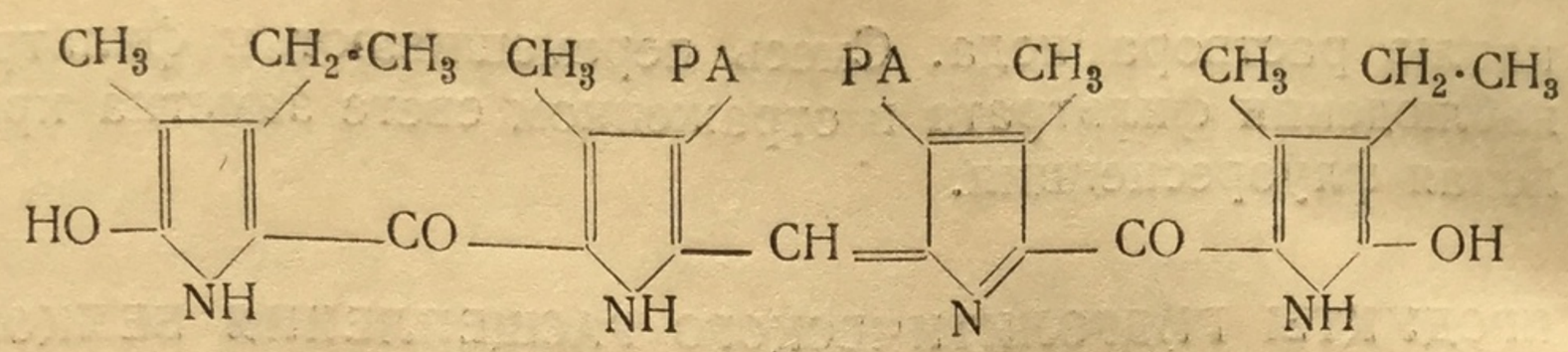
Красная

Оранжевая



Мезобилипурпурин (красный)

Желтая



Мезохолетелин (желтый)

Окраски реакции с HNO_3

$$PA = -CH_2 - CH_2 - COOH$$

Аналогичный ряд продуктов окисления и аналогичный ряд окрасок получается при действии азотной кислоты (содержащей HNO_2) на билирубин.

1. Для открытия желчных пигментов в желчи ее разводят в четыре раза водой и в пробирке осторожно наслаивают на 1—2 мл концентрированной азотной кислоты, содержащей азотистую. На границе двух слоев появляется осадок желчных кислот и несколько цветных колец: зеленое, синее, фиолетовое, красное, желтое, обусловленных образованием продуктов окисления желчных пигментов. При стоянии все они окисляются в желтый холетелин.

Эту же реакцию делают, предварительно профильтровав желчь повторно через бумажный фильтр, на который затем наносят каплю концентрированной азотной кислоты. Желчные пигменты задерживаются на бумаге фильтра и поэтому после добавления кислоты появляется ряд концентрических цветных колец.

2. Для открытия билирубина в сыворотке пользуются реакцией с диазотированной сульфаниловой кислотой, с которой билирубин дает розово-красное окрашивание. Эта реакция получается часто только после того, как белки сыворотки удалены осаждением спиртом. В норме сыворотка содержит 0,25—0,6 мг% билирубина. При концентрации билирубина в сыворотке выше 1 мг % он появляется в моче.

К 1 мл сыворотки добавляют 2 мл воды и затем 0,25 мл свежеприготовленного раствора диазотированной сульфаниловой кислоты. Этот раствор получают, смешивая 10 мл раствора 0,5 г сульфаниловой кислоты и 7,0 мл 25% соляной кислоты в 1000 мл воды с 0,2 мл 0,5% раствора нитрита натрия. Если окрашивания не появляется, то к 1 мл сыворотки добавляют 2 мл спирта, перемешивают и удаляют осадок белков центрифугированием. К прозрачному центрифугату добавляют раствор диазотированной сульфаниловой кислоты.

3. Для открытия желчных пигментов в моче ее осторожно наслаивают в пробирке на концентрированную азотную кислоту, содержащую HNO_2. На границе двух слоев появляются цветные кольца. Эту же пробу делают после адсорбции желчных пигментов на фильтровальную бумагу.

4. Для открытия уробилина к 5 мл мочи добавляют насыщенного спиртового раствора уксуснокислого цинка и затем одну

каплю раствора иода. Смесь перемешивают и фильтруют. При наблюдении фильтрата в отраженном свете заметна красивая зеленая флуоресценция.

ПРОДУКТЫ ГИДРОЛИТИЧЕСКОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ БЕЛКОВ И ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ И ПОЛИПЕПТИДОВ

Изучению физиологического акта пищеварения посвящены классические работы великого русского физиолога акад. И. П. Павлова и его учеников. Основные результаты этих исследований изложены И. П. Павловым в его замечательном сочинении «Лекции о работе главных пищеварительных желез».

Белки пищи подвергаются в желудочно-кишечном тракте животных действию ряда пищеварительных соков, содержащих протеокластические и пептокластические ферменты. В результате воздействия протеаз и полипептидаз желудочно-кишечного тракта белки пищи претерпевают полное гидролитическое расщепление с образованием аминокислот. В качестве промежуточных продуктов этого энзиматического гидролиза образуются пептоны, полипептиды и дипептиды. Только аминокислоты и, отчасти, как показали Е. Лондон и Н. Кочнева, полипептиды всасываются стенкой кишечника в кровь; нерасщепленные белки и продукты их начального гидролиза в норме не всасываются. Проникновение нерасщепленных белков через кишечную стенку, также как и парэнтеральное введение белков, влечет за собою образование антител и анафилактические явления. Поэтому энзиматический гидролиз белков пищи не только подготовляет их к всасыванию в виде аминокислот, но имеет и значение защитной реакции организма, препятствующей проникновению чужеродных белков.

Энзиматический гидролиз белковых веществ пищи начинается у млекопитающих в желудке под действием желудочного сока, имеющего кислую реакцию pH=1,2 (на высоте пищеварения содержимое желудка имеет pH=1,3—2,5), содержащего соляную кислоту и пепсин. Пепсин — протеаза (протеиназа), ускоряющая гидролиз белков, находящихся в состоянии амфкатионов. Оптимум активности пепсина лежит около pH=2 и несколько отличен для различных белков. При pH>5,0 действие пепсина прекращается, а при pH>8,0 пепсин необратимо инактивируется.

Пепсин — белковое вещество с молек. весом ~ 38 000 и изоэлектрическим пунктом при pH=2,7. Железистыми клетками слизистой желудка выделяется неактивный зимоген пепсина — пепсиноген, который при кислой реакции желудочного сока, создающейся в результате секреции соляной кислоты слизистой фундальной части желудка, превращается в активный пепсин (см. работу 29).

Продуктами пептического гидролиза белков являются преимущественно альбумозы и пептоны. При длительном воздействии пепсина, при оптимальных условиях, в качестве продуктов гид-

ролиза образуются в ограниченном количестве аминокислоты. Не все белки одинаково легко подвергаются пептическому гидролизу. Сравнительно слабо расщепляются пепсином коллагены и эластины и совсем не расщепляются кератины, муцины, фиброин, овомукоид и некоторые другие белки.

Кроме протеолитической активности пепсину свойственна и коагулазная активность, т. е. способность ускорять свертывание молока, заключающееся в энзиматическом превращении казеина молока в параказеин и сывороточную альбумозу. В присутствии ионов кальция параказеин образует параказеинат кальция, выделяющийся в виде геля (см. работу 31). Оптимум коагулазного действия пепсина pH=5,3.

Коагулазное действие еще более выражено у другого фермента — химозина (реннина), находящегося, наряду с пепсином, в желудочном соке молодых млекопитающих. Оптимум активности химозина pH=3,5—5,3. Химозин — некоагулирующая протеаза с изоэлектрическим пунктом при pH=4,5, в противоположность пепсину сохраняющая активность при pH>9,0.

В кишечнике, где пищевая масса приобретает кислотность близкую к pH=7,0, белки пищи и альбумозы, и пептоны, образовавшиеся в результате желудочного пищеварения, подвергаются дальнейшему гидролизу при действии ферментов панкреатического сока: трипсина (трипсиназы), химотрипсина (протаминазы) и карбоксиполипептидазы.

Трипсин — протеаза, ускоряющая гидролиз белков, находящихся в состоянии амфанионов, с оптимумом активности при pH=8,0. Трипсин — белковое вещество с молекулярным весом ~34 000. В панкреатической железе образуется неактивный трипсиноген, который при действии специфического активатора — энтерокиназы, выделяемой слизистой двенадцатиперстной кишки и тонкого отдела кишечника, превращается в трипсин (см. работу 30). Энтерокиназа открыта И. П. Павловым и Шеповальниковым. Трипсин ускоряет гидролиз пептидных связей белков, альбумоз и пептонов. Многие нативные белки лишь с трудом расщепляются трипсином. Триптический гидролиз таких белков идет значительно быстрее после их денатурации или после предварительного расщепления пепсином. Продуктами триптического гидролиза являются поли- и дипептиды и аминокислоты. Трипсину свойственно и коагулазное действие.

Химотрипсин — вторая протеаза панкреатического сока, обладающая более высоким, чем у трипсина, коагулазным действием. Клетками панкреатической железы образуется неактивный химотрипсиноген, который превращается в химотрипсин при действии трипсина. Химотрипсин, подобно трипсину, ускоряет при pH=7,6 гидролиз белков, альбумоз и пептонов, а также и протаминов.

Энзиматический гидролиз полипептидов и дипептидов, образовавшихся в результате триптического расщепления, заканчивается в кишечнике под действием карбоксипептидазы панкреа-

тического сока и комплекса поли- и дипептидаз, выделяемых слизистой тонких кишок. Этот комплекс, носящий часто название эрепсина, включает аминополипептидазу, пролидазу, пролиназу и другие депептидазы. Под воздействием всех этих ферментов поли- и дипептиды гидролизуются до аминокислот.

Большинство аминокислот, образовавшихся при переваривании белков пищи, всасывается в кровь стенкой кишечника, но некоторая часть их избегает всасывания, так как подвергается ряду превращений за счет действия ферментов микроорганизмов кишечной флоры. В этих процессах микробиального разложения белков (так называемого гниения) в кишечнике существенную роль играет реакция декарбоксилирования аминокислот, подробно исследованная лауреатом Сталинской премии С. Р. Мордашевым. Процессы гниения приводят к образованию из тирозина фенола и крезола, из триптофана — индола и скатола, из орнитина и лизина — путресцина и кадаверина. Соединения эти частью также всасываются в кровь, причем фенолы, индол и скатол обезвреживаются в печени путем превращения в глюкозиды глюкуроновой кислоты или эфиры серной кислоты и в таком виде выделяются с мочой.

Протеазы и пептидазы обнаружены не только в составе пищеварительных соков, но и во многих животных и некоторых растительных тканях. Протеаза животных тканей — катепсин ускоряет гидролиз белков, находящихся в изоэлектрическом или близком к изоэлектрическому состояниях. Оптимум активности катепсина лежит при pH=4—5; при pH близких к 7,0 он неактивен. Поэтому действие катепсина становится особенно заметным при посмертном автолизе тканей, когда [H·] тканей повышается. Катепсин активируется соединениями, содержащими сульфгидрильные группы. Катепсин гидролизует белки с образованием альбумоз и пептонов. В тканях катепсин находится, обычно, вместе с пептидазами и дипептидазами. Он найден во многих животных тканях, но особенно богаты им ткани печени, почек и селезенки. По некоторым данным катепсин встречается также в составе желудочного сока.

Работа 123. **Кислотные и щелочные альбуминаты**

Кислотные альбуминаты, образующиеся при действии на белки кислот, нерастворимы в воде и солевых растворах, но легко растворимы в разбавленных кислотах и щелочах. Кислотные альбуминаты не коагулируют при нагревании их растворов и из кислых растворов выпадают при добавлении щелочей при слабокислой реакции, а из щелочных растворов при добавлении кислот — при слабощелочной реакции.

Щелочные альбуминаты, образующиеся при действии на белки едких щелочей, также нерастворимы или очень мало растворимы в воде и солевых растворах, но легко растворимы в разбавленных

кислотах и щелочах. При нагревании растворов щелочных альбуминатов не происходит их осаждения. Щелочные альбуминаты коагулируют из кислых растворов при нейтрализации, а из щелочных растворов — при добавлении кислот, при слабокислой реакции.

Как кислотные, так и щелочные альбуминаты осаждаются из кислых растворов при насыщении средними солями. Кислотные альбуминаты при осторожном нагревании в щелочных растворах переходят в щелочные альбуминаты, последние же не могут быть переведены в кислотные альбуминаты, так как представляют собой продукты более глубокого изменения молекулы белка.

1. Кислотный альбуминат. 3 мл белка куриного яйца смешивают с 1 мл ледяной уксусной кислоты. После некоторого стояния добавляют воду, перемешивают и отфильтровывают раствор кислотного альбумината от незначительного количества нерастворимого осадка. Раствор делят на три части. Первую нагревают до кипения, причем осаждения не происходит. Ко второй части добавляют несколько капель раствора лакмоида и по каплям разбавленный раствор едкого натра. Уже при слабокислой реакции образуется осадок кислотного альбумината. К жидкости с осадком добавляют еще раствор едкого натра, причем осадок растворяется. При добавлении кислоты к полученному щелочному раствору осадок образуется снова при слабощелочной реакции. К третьей части раствора кислотного альбумината добавляют до насыщения хлористого натрия, причем образуется осадок альбумината.

2. Щелочной альбуминат. К 3 мл белка куриного яйца добавляют несколько капель 30%-ного раствора едкого натра при помешивании до образования студнеобразной массы. Затем добавляют воды и полученный раствор нагревают до кипения. Коагуляции при этом не происходит. Охлажденный раствор делят на две части. К первой части раствора прибавляют несколько капель лакмоида и затем по каплям разбавленной уксусной кислоты. Щелочной альбуминат осаждается при слабокислой реакции. При дальнейшем добавлении уксусной кислоты образовавшийся осадок растворяется; к кислому раствору добавляют разбавленный раствор щелочи до слабокислой реакции, причем щелочной альбуминат снова коагулирует. Ко второй части раствора, после осторожной нейтрализации разбавленной уксусной кислотой, добавляют до насыщения хлористый натрий, причем образуется осадок щелочного альбумината.

Работа 124. **Альбумозы и пептоны**

Для нижеследующих опытов пользуются раствором пептона в 3—5%-ном растворе хлористого натрия.

1) При нагревании раствора до кипения не происходит коагуляции.

2) К раствору в нескольких пробирках добавляют по каплям до осаждения азотной, уксусной и сульфосалициловой кислоты. Образующиеся осадки при нагревании раствора растворяются и при охлаждении снова выпадают. Этим образовавшиеся осадки, обусловленные присутствием альбумоз, отличаются от подобных же осадков белков.

3) Раствор подкисляют уксусной кислотой и добавляют несколько капель раствора железистосинеродистого калия. Выпадает осадок, растворяющийся при нагревании и вновь появляющийся при охлаждении.

4) Раствор, подкисленный уксусной кислотой, насыщают, добавляя твердый сернокислый аммоний. При этом альбумозы выпадают в осадок. Осадок отфильтровывают, растворяют в 3—5%-ном растворе хлористого натрия и с полученным раствором делают биуретовую реакцию (красноватый оттенок здесь сильнее выражен, чем у белков). В фильтрате остаются пептоны, которые открывают с помощью той же биуретовой реакции и осаждением с фосфорновольфрамовой и сульфосалициловой кислотой и с танином.

Работа 125. **Продукты пептического гидролиза белков**

К 1 мл разбавленного физиологическим раствором в два раза белка куриного яйца прибавляют 10 мл 0,1%-ного раствора пепсина в 0,2%-ной соляной кислоте и ставят смесь в термостат при 37° на 25—30 минут. После этого к жидкости добавляют несколько капель раствора лакмоида и осторожно разбавленный раствор едкого натра до слабокислой реакции; при этом выпадает осадок кислотного альбумината, который отфильтровывают. Фильтрат нагревают до кипения, причем выпадает в осадок неизмененный белок. Осадок отфильтровывают от еще горячей жидкости и в полученном фильтрате открывают альбумозы и пептоны, как это описано в разделе 4 предыдущей работы.

Работа 126. **Продукты триптического гидролиза белков**

20 мл 4—5%-ного раствора казеина в 0,5%-ном растворе соды смешивают с 2—3 мл раствора трипсина и оставляют в термостате при 37° на 30—40 минут. После этого жидкость осторожно подкисляют до слабокислой (на лакмоид) реакции и отфильтровывают выпавший осадок щелочного альбумината. Фильтрат нагревают до кипения, причем выпадает в осадок белок. Жидкость фильтруют еще горячей и в фильтрате открывают альбумозы и пептоны (как в предыдущей работе), а затем открывают свободный триптофан, для чего 5—3 мл гидролизата нейтрализуют уксусной кислотой, добавляют 1 мл амилового алкоголя и затем по каплям свежеприготовленную бромную воду. Хорошо встряхивают. В присутствии триптофана слой амилового алкоголя окрашивается в красно-фиолетовый цвет.

Избыток бромной воды обесцвечивает образующееся окрашенное соединение. Реакцию можно вести и не употребляя амилового алкоголя.

Работа 127. **Действие комплекса ферментов эрепсина**

Для получения эрепсина снятая свежая слизистая оболочка кишечника извлекается пятикратным объемом 87%-ного глицерина. После двухдневного настаивания добавляют три объема воды и жидкость центрифугируют и отделяют от осадка. Таким образом, получают экстракт, содержащий комплекс ферментов эрепсина (аминополипептидазу и дипептидазы), наряду с некоторым количеством неактивного белка.

К раствору пептонов, полученному в результате гидролиза белка пепсином (см. работу 125), добавляют экстракт, содержащий комплекс ферментов эрепсина, и ставят в термостат при 40°. Время от времени берут пробу, в которой после осаждения белков кипячением делают биуретовую пробу. Проба дает фиолетово-красное окрашивание, постепенно исчезающее по мере гидролиза полипептидов. Параллельно ставят опыт с таким же количеством инактивированного кипячением экстракта эрепсина. В этом опыте не наблюдается исчезновения или ослабления окраски биуретовой реакции. С раствором, полученным после эрептического гидролиза, проделывают цветные реакции на аминокислоты.

Работа 128. **Определение активности пептического действия**

Метод основан на том, что казеин осаждается из кислого раствора уксуснокислым натрием, а продукты пептического гидролиза при этих условиях остаются в растворе.

Берут десять чистых и выщелоченных паром пробирок и наливают в первую и вторую по 1 мл раствора пепсина в 0,2%-ной соляной кислоте. Затем во вторую наливают 1 мл воды, смешивают и 1 мл смеси переносят в третью пробирку. Добавляют в третью пробирку 1 мл воды, смешивают и снова 1 мл смеси переносят в четвертую пробирку. Продолжая дальше такое же разведение ферментного раствора до десятой пробирки (в которой оставляют 1 мл, а 1 мл выбрасывают), получают геометрический ряд разведений, т. е. разведения в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 и т. д. раз. В одиннадцатую пробирку, которая служит в качестве контрольной, вносят 1 мл 0,2%-ной соляной кислоты.

Теперь во все пробирки наливают по 10 мл 0,1%-ного кислого раствора казеина. Такой раствор готовят, растворяя 1 г казеина при нагревании на водяной бане в 10 мл 20%-ной соляной кислоты и прибавляя затем воду до объема 1000 мл. Все пробирки помещают в термостат на 20 минут при температуре 38°. После этого во все пробирки наливают по нескольку капель 25%-ного раствора уксуснокислого натрия. При этом нерасщепленный казеин вы-

падает в осадок, а продукты пептического расщепления не коагулируют. Таким образом, можно определить ту минимальную концентрацию исследуемого раствора фермента, при которой в условиях опыта произошло расщепление 10 мл раствора казеина, а затем подсчитать количество миллилитров казеинового раствора, которое могло бы быть полностью расщеплено 1 мл неразведенного раствора фермента. Если, например, помутнение (выпадение казеина) произошло во всех пробирках, начиная с шестой, то пробиркой с минимальной концентрацией фермента, в которой еще произошло расщепление, является пятая, т. е. пробирка с разведением в 16 раз. Следовательно, 1 мл неразведенного раствора пепсина при 38° и за 20 минут мог бы полностью расщепить 160 мл 0,1%-ного раствора казеина. Можно принять за единицу пептического действия полное расщепление 10 мл 0,1%-ного раствора казеина (т. е. 0,01 г казеина) при 38° за 20 минут. Тогда пептическое действие в рассматриваемом примере будет равно 16 единицам.

О точности описанного определения с геометрическим рядом и о способе повысить эту точность см. работу 39.

Работа 129. **Определение пептической активности по расщеплению глобина крови**

Метод основан на том, что глобин крови быка осаждается аммиаком из солянокислого раствора в то время, как продукты его пептического гидролиза остаются в растворе.

Прежде всего готовят геометрический ряд разведений исследуемого раствора фермента. Для этого в первые две из 10 пробирок помещают по 1 мл раствора пепсина. Затем во вторую добавляют 1 мл 0,1 н. соляной кислоты. Перемешивают и 1 мл смеси переносят в третью пробирку. Продолжая такое разбавление до 10-ой пробирки, получают геометрический ряд разведений фермента. Затем во все пробирки добавляют по 1 мл раствора глобина в 0,1 н. соляной кислоте (приготовление см. работу 122, А), хорошо размешивают и ставят на 15—20 минут в термостат при 38 или 40°.

По окончании нагревания во все пробирки добавляют по 5 капель 10%-ного раствора хлористого аммония и по 2 мл 1%-ного аммиака. При этом в пробирках, где находится еще нерасщепленный глобин, образуется мелкий хлопьевидный осадок. Определяют минимальную концентрацию исследуемого препарата пепсина, достаточную для полного гидролиза взятого количества глобина. Для более точного определения этой концентрации необходимо составление дополнительного ряда разведений, как это указано в работе 39.

Работа 130. **Определение пептической активности по расщеплению белков сыворотки крови**

При действии пепсина на мутную от прибавления сульфосалициловой кислоты сыворотку крови при достаточно полном

расщеплении белков наблюдается просветление. Пользуясь геометрическим рядом разведений исследуемого раствора фермента, определяют, как и в предыдущих случаях, минимальную концентрацию, при которой наблюдается просветление сыворотки.

Для получения мутного раствора белков сыворотку разбавляют в 10—15 раз водою и затем при хорошем перемешивании добавляют 10%-ный раствор сульфосалициловой кислоты до ясного окрашивания бумаги конго в синий цвет. В этот момент жидкость делается мутной как молоко, но не содержит хлопьев и имеет pH=1,8—2,0, т. е. реакцию наиболее благоприятную для действия пепсина.

Составив геометрический ряд разведений исследуемого раствора пепсина и добавив в каждую пробирку по 5 мл мутного раствора белка, наблюдают через определенное время, в каких пробирках жидкость сделалась прозрачной.

Работа 131. **Определение триптического действия с помощью формольного титрования**

Триптический гидролиз белков и полипептидов приводит к накоплению свободных карбоксильных и аминогрупп. Определяя количественно карбоксильные группы формольным титрованием, можно следить за течением триптического гидролиза.

В колбу на 200 мл помещают 30 мл раствора казеина в растворе соды и 20 мл активного экстракта трипсина. Перемешивают, сейчас же отбирают 10 мл жидкости, а колбу помещают в термостат при 38 или 40°. К взятой пробе добавляют несколько капель фенолфталеина и затем 0,1 н. серной кислоты до исчезновения розового окрашивания. Теперь к нейтрализованной пробе добавляют 5 мл нейтрализованного по фенолфталеину до слаборозовой окраски 40% раствора формальдегида и титруют 0,05 н. раствором едкого натра до появления яснокрасной окраски (pH=8,8—9,0). Предварительно такую окраску получают титрованием контрольной пробы, в которой вместо исследуемого раствора берут 10 мл прокипяченной воды. Количество 0,05 н. щелочи, пошедшей в контрольном опыте, вычитают из результатов основного титрования. Затем из колбы через каждые 20—40 минут отбирают пробы по 10 мл и титруют их таким же образом. Для того, чтобы изобразить результаты определений графически, откладывают по оси абсцисс время, а по оси ординат объемы пошедшей на титрование щелочи или же соответствующие им величины аминоазота (1 мл 0,05 н. раствора едкого натра соответствует 0,7 мг аминоазота).

Повторяют определение, беря вместо раствора казеина 4%-ный раствор пептона.

Для описанных определений можно вместо формольного титрования применить титрование в водно-алкогольной среде (см. работу 114).

Работа 132. **Определение активности триптического действия**

Этот метод основан на том, что на известных ступенях расщепления казеина образуются продукты расщепления, не выпадающие в осадок при подкислении раствора алкогольным раствором уксусной кислоты.

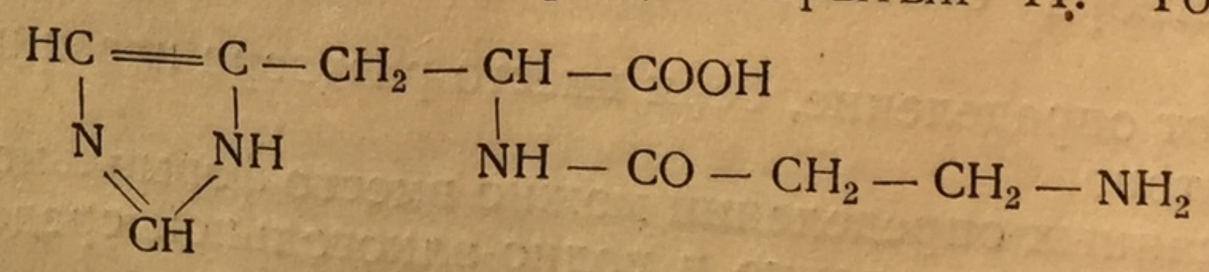
Совершенно аналогично описанному в работе 128 готовят геометрический ряд разведений слабощелочного раствора трипсина. Затем во все пробирки прибавляют по 2 мл 0,1%-ного раствора казеина. Такой раствор готовят, растворяя при нагревании на водяной бане 0,1 г казеина в 100 мл 0,1%-ного раствора соды. Все пробирки помещают в термостат при 38° на 60 минут. По окончании нагревания во все пробирки наливают по 5 капель 1%-ного алкогольного раствора уксусной кислоты (1 г ледяной уксусной кислоты, 49 г воды и 50 г 96%-ного алкоголя). При этом помутнение появляется только в тех пробирках, где еще остался нерасщепленный казеин.

Если, например, последняя оставшаяся прозрачной пробирка шестая, т. е. пробирка с разведением исследуемого ферментного раствора в 32 раза, то 1 мл неразведенного раствора трипсина мог бы расщепить $2 \times 32 = 64$ мл казеинового раствора. Если теперь за единицу триптического действия принять расщепление 1 мл 0,1%-ного раствора казеина за 60 минут при 38°, то активность ферментативного действия в рассматриваемом примере равна 64 единицам.

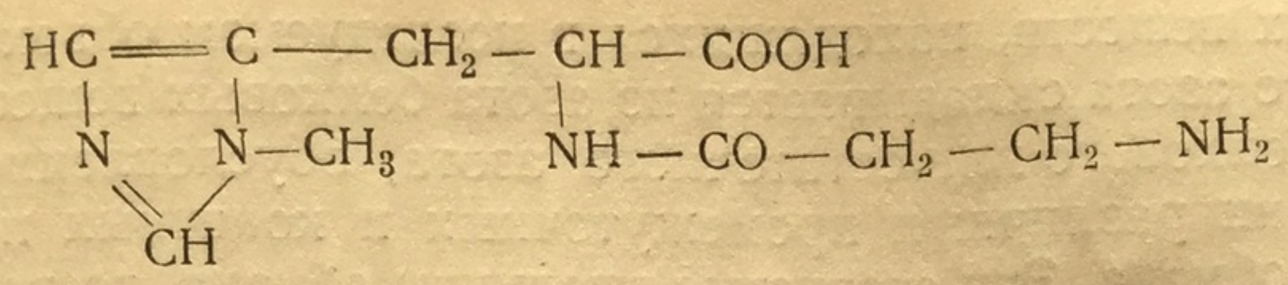
Работа 133. **Действие дипептидазы слизистой тонких кишок или ткани почек**

В качестве раствора дипептидазы служит глицериновый экстракт из слизистой оболочки тонких кишок или почки собаки. Такой экстракт получают настаиванием в течение 5—10 дней 50 г измельченной ткани почки с 100 мл 87%-ного глицерина, подкисленного 0,5 мл 20%-ной уксусной кислоты. Лучше пользоваться очищенным от посторонних белков экстрактом, содержащим дипептидазу (см. Приготовление реактивов).

Изучают катализируемый дипептидазой гидролиз дипептида карнозина. Карнозин, открытый акад. В. С. Гулевичем,— единственный дипептид, находящийся среди экстрактивных веществ скелетных мышц млекопитающих и многих других позвоночных животных, кроме птиц и рыб, у которых вместо карнозина находится метилкарнозин — ансерин, открытый Н. Толкачевской.



Карнозин



Ансерин

В скелетных мышцах собаки и кошки присутствуют как карнозин, так и ансерин. Карнозин отсутствует в составе крови, органов, в сердечной и гладких мышцах. Содержание карнозина в мышцах быка около 460 мг %.

Для получения раствора, содержащего карнозин, 50 г хорошо измельченной мышечной ткани, взятой от только что убитого животного, трехкратно экстрагируют 250 мл воды при температуре 80° (на водяной бане). Полученные экстракты соединяют вместе, слабо подкисляют уксусной кислотой и осаждают белки кипячением, после чего отфильтровывают осадок белков и слегка промывают водой. Экстракт и промывные воды доводят осторожным добавлением 0,1 н. NaOH до нейтральной реакции (pH=7,0) и упаривают на водяной бане до объема 50 мл. Таким образом, получают концентрированный экстракт, содержащий все экстрактивные вещества мышечной ткани и среди них дипептид карнозин.

Берут три колбы. В первую помещают 10 мл полученного экстракта, 15 мл м./15 фосфатной буферной смеси с pH=7,8, 5 мл раствора дипептидазы и 3—4 капли хлороформа, во вторую колбу— такую же смесь, но с 5 мл предварительно прокипяченного раствора фермента и в третью — контрольную колбу — такую же смесь, за исключением 10 мл экстракта мышечной ткани. Все колбы закрывают пробками и ставят в термостат при 38° на 24 часа. После этого все колбы охлаждают, в третью, контрольную, добавляют 10 мл экстракта мышц и сейчас же определяют во всех трех аминоазот, пользуясь газометрическим методом (см. работу 115).

Перед определением аминоазота во всех пробах можно предварительно осадить белки добавлением 5 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты.

По разности между величиной аминоазота в основном опыте (первая колба) и в третьей контрольной колбе не только можно судить о наличии процесса гидролиза карнозина, ускоряемого дипептидазой, но и определить содержание последнего в исследуемом экстракте мышцы. Во второй колбе с ферментом, необратимо инактивированным нагреванием, гидролиза не наблюдается.

ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФРАКЦИЙ АЗОТИСТЫХ ВЕЩЕСТВ ТКАНЕЙ

При определении содержания азота в различных биохимических объектах: тканях, органах и жидкостях организма, после их полной минерализации получают величину так называемого общего азота, являющегося суммой содержания азота всех азот-

содержащих веществ, находящихся в исследуемом объекте. Величина общего азота складывается из азота белковых веществ ткани и азота небелкового или остаточного азота, обусловленного наличием в ткани различных промежуточных и конечных продуктов азотистого обмена. Эти азотистые продукты обмена, составляющие небелковый азот ткани, могут быть во многих случаях выделены и определены путем экстрагирования ткани водой и осаждения в полученном водном экстракте белковых веществ, после чего небелковые азотистые вещества остаются в водном экстракте и поэтому носят название азотистых экстрактивных веществ ткани.

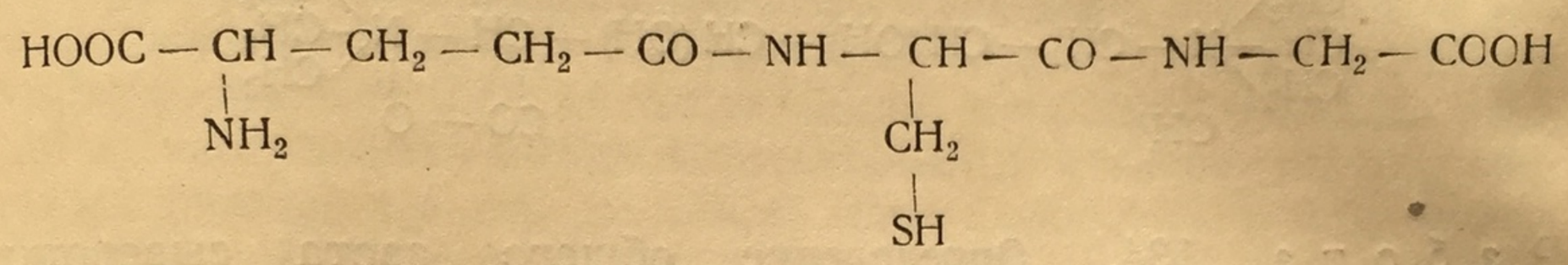
Для определения содержания белкового и небелкового (остаточного) азота тем или иным путем, но, по возможности, количественно, осаждают белки, после чего минерализуют белковый осадок и определяют азот белка или же минерализуют безбелковый фильтрат и определяют небелковый азот. Так как в сумме эти две величины должны быть равны величине общего азота, то, зная, например, общий азот и небелковый, можно по разности найти белковый и наоборот.

Для осаждения белков пользуются тепловой коагуляцией или же осаждением белков с помощью различных осадителей: трихлоруксусной, метафосфорной, фосфорновольфрамовой, фосфорномолибденовой, сульфосалициловой кислот, спирта, вольфрамата натрия, гидратов окислов меди и цинка, уксуснокислого уранила. Все эти способы осаждения белков не дают совершенно одинакового результата, так как одни осадители вызывают более полное, другие — менее полное осаждение азота. Так, например, фосфорновольфрамовая и фосфорномолибденовая кислоты осаждают не только белки, но и полипептиды и некоторые органические основания, в то время как метафосфорная и трихлоруксусная кислоты осаждают только белки. Это различие может быть использовано для определения, кроме остаточного азота, и азота полипептидов. С другой стороны, если уксуснокислый уранил не всегда дает совершенно полное осаждение белков, то гидрат окиси цинка, наоборот, кроме белков, осаждает еще глутатион и часть мочевой кислоты и креатинина, т. е. часть небелкового (остаточного) азота. Пользуясь тем или другим осадителем следует, таким образом, иметь в виду его особенности, а также и то, что результаты осаждения зависят не только от характера осадителя, но и от условий, в которых ведется осаждение.

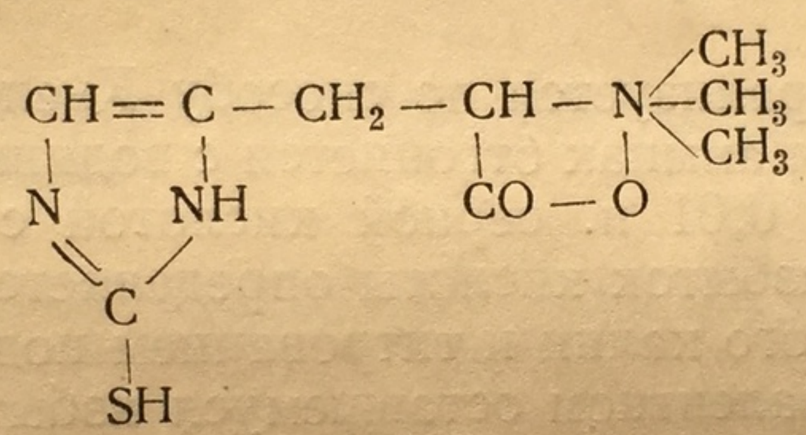
Содержание азота для многих белков близко к 16%. Поэтому, зная количество белкового азота ткани, можно вычислить количество белка, умножая найденный белковый азот на 100/16 = =6,25. Получающийся при этом результат во многих случаях довольно близко выражает количество белка. Однако, некоторые белки в содержании азота значительно уклоняются от указанной величины, что необходимо принимать во внимание при расчетах. Например, повышенное содержание азота характерно для колла-

гена (17,8%), некоторых кератинов (17,5%), гистонов (17—20%), эдестина (18,7%) и других растительных глобулинов.

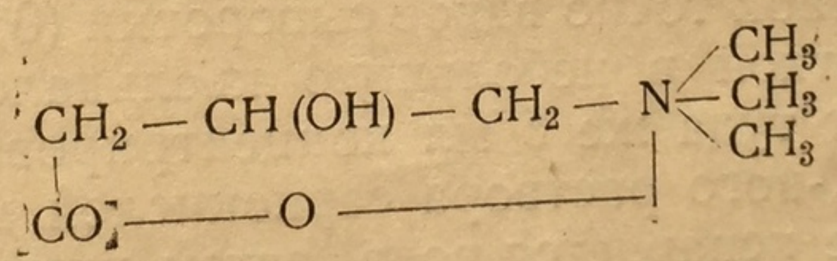
Определение содержания белкового и небелкового азота не дает полного представления о состоянии обмена азотистых веществ в ткани. Для этого необходимо более подробное исследование отдельных фракций как белкового, так и, особенно, небелкового азота, т. е. исследование отдельных промежуточных и конечных продуктов азотистого обмена, находящихся в ткани. Эти фракции для различных тканей отличаются, прежде всего, качественно. Так, небелковый (остаточный) азот крови составляют: азот мочевины, аминокислот, креатина, креатинина, пуриновых оснований, мочевой кислоты, глутатиона,



эрготионеина (бетаина тиолгистидина)



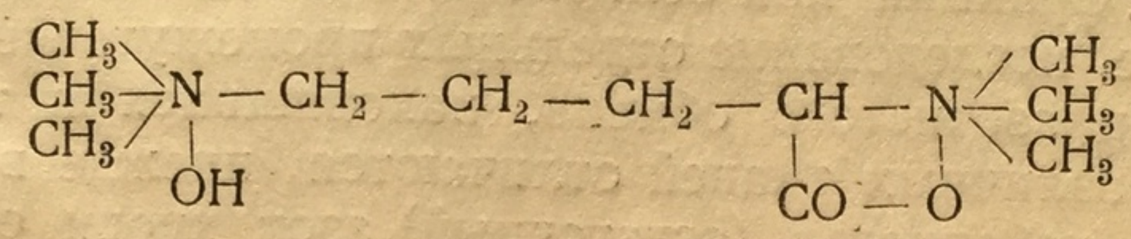
билирубина, индикана, аммиака, а небелковый азот (азот экстрактивных веществ) мышечной ткани составляют: азот креатина, креатинина, фосфагена, саркозина (метилглицина), карнозина, ансерина, карнитина (бетаина β-окси-γ-аминомасляной кислоты),



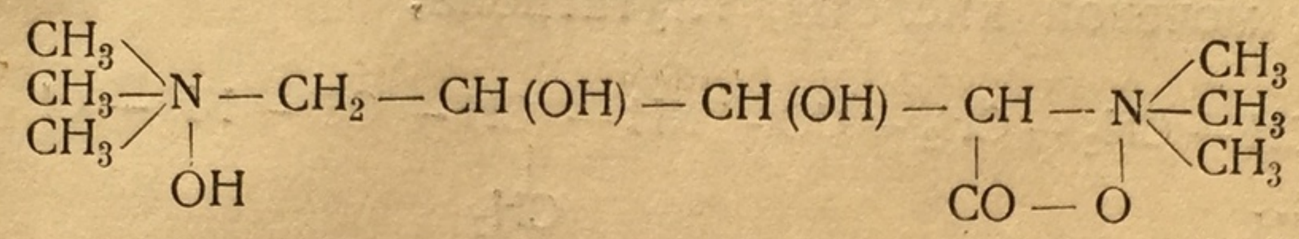
аденозинфосфорных кислот, мочевины и некоторых других азотистых соединений. Количественное содержание отдельных фракций небелкового азота также различно для различных тканей. Так, например, азот мочевины составляет главную часть остаточного азота крови (около 50% всего остаточного азота), в то время как в мышцах азот мочевины составляет лишь ничтожную долю небелкового азота.

Азотистые соединения, составляющие фракцию небелкового азота, кроме того, различны в тканях различных видов животных. Например, мышцы пойкилотермных животных отличаются высоким, сравнительно с мышцами гомойотермных животных, содержанием таврина. В мышцах некоторых рыб и ракообразных находятся бетаин, триметиламиноксид и холин. Кроме

того, в мышцах ракообразных нет креатина и фосфагена, а вместо них находятся аргинин и аргининфосфорная кислота. Для мышц птиц характерно присутствие в их составе ансерина (метилкарнозина), а в мышцах собаки и лошади находится миокинин (бетаин орнитина или диоксиорнитина):

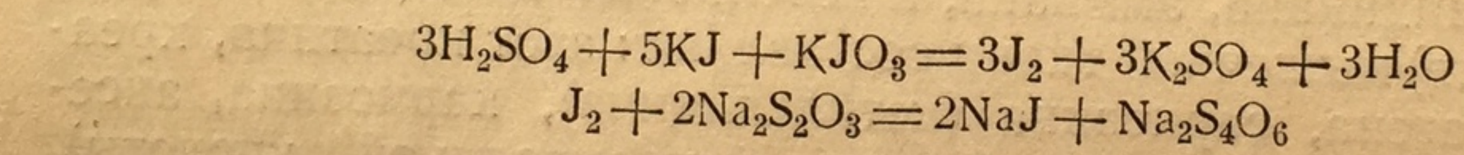


или



Работа 134. Определение общего азота сыворотки крови

Сыворотка минерализуется по способу Кьельдаля (см. работу 12), образовавшийся аммиак отгоняется с водяным паром и поглощается избыточной 0,01 н. серной кислотой с добавкой иодата калия, после чего избыток кислоты определяется иодометрически добавлением иодистого калия и титрованием иода, выделившегося в количестве, эквивалентном оставшемуся избытку кислоты, тиосульфатом:



$$3H_2SO_4 + 5KJ + KJO_3 = 3J_2 + 3K_2SO_4 + 3H_2O$$
$$J_2 + 2Na_2S_2O_3 = 2NaJ + Na_2S_4O_6$$

0,1 мл разведенной точно вдвое сыворотки (0,05 мл сыворотки) вносят микропипеткой в небольшую кьельдалевскую колбу на 100 мл, добавляют туда же 5 мл концентрированной серной кислоты и 1 мл 10%-ного раствора сернокислой меди и нагревают на сетке. Вначале испаряется вода, затем жидкость буреет, при дальнейшем нагревании происходит просветление жидкости, и, наконец, она приобретает слабоголубоватую окраску. Тогда, дав колбе охладиться, переносят количественно ее содержимое в колбу, соединенную с парообразователем и холодильником, как это показано на рис. 1. В приемник отмеривают 10 мл 0,01 н. серной кислоты и 1 мл 0,1 н. раствора KJO_3 (иодата калия). Опускают конец холодильника в жидкость в приемнике и через воронку вводят в колбу 20 мл 30%-ного, не содержащего аммиак, раствора едкого натра и заменяют воронку стеклянной пробкой. Отгоняют аммиак с водяным паром до тех пор, пока стекающая из холодильника жидкость не перестанет окрашивать в синий цвет лакмусовую бумажку. Тогда приемник опускают и через три минуты прекращают отгонку.

К жидкости в приемнике добавляют 3—4 мл свежеприготовленного 5% раствора иодистого калия и через пять минут 2—3 капли раствора крахмала. Жидкость, окрашенную в синий цвет, титруют до обесцвечивания 0,01 н. раствором тиосульфата. Появление окраски у обесцвеченного раствора через 5—10 минут по окончании титрования не имеет значения.

Теперь ставят контрольный опыт для того, чтобы учесть возможное содержание аммиака в реактивах. Этот опыт ведут совершенно так же, но без сыворотки. По разности между титрованием в контрольном и основном опыте находят число миллилитров 0,01 н. $Na_2S_2O_3$, эквивалентных связанной аммиаком 0,01 н. серной кислоте.

Как видно из вышеприведенных уравнений, 1 мл 0,01 н. кислоты отвечает 1 мл 0,01 н. $Na_2S_2O_3$ и, следовательно, 1 мл 0,01 н. $Na_2S_2O_3$ отвечает 0,14 мг азота. Если, например, разность в мл 0,01 н. тиосульфата между контрольным и основным опытом оказалась равной 4,4 мл, то общий азот сыворотки в мг% будет: $0{,}14 \times 4{,}4 \times 100/0{,}05 = 1232$ мг%, или 1,232 г в 100 мл сыворотки.

Работа 135. **Определение белкового азота и белка сыворотки крови**

Белки сыворотки осаждаются трихлоруксусной кислотой, осадок минерализуется серной кислотой в присутствии катализатора и образовавшийся аммиак отгоняется и определяется ацидиметрически (см. работу 12).

В маленькую короткую пробирку вносят 1 мл сыворотки крови и затем равный объем 20%-ной трихлоруксусной кислоты. Перемешав жидкость, оставляют стоять 10 минут и затем выливают на маленький бумажный фильтр. Остатки осадка из пробирки выполаскивают на тот же фильтр 2—3 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты. Промывают осадок 1 мл той же кислоты и, подсушив фильтр, переносят его с осадком в колбу Кьельдаля. Добавляют туда же 0,2 г сернокислой меди, 2 г сернокислого калия и 10 мл концентрированной серной кислоты. Минерализацию и дальнейшую отгонку аммиака ведут так же, как это описано в работе 12. В приемник для поглощения аммиака помещают 20 мл 0,1 н. серной кислоты и несколько капель смешанного индикатора (метилрот-метиленблау; см. реактивы) или метилрот. Разность между взятой 0,1 н. серной кислотой и обратно оттитрованной дает число миллилитров кислоты, связанной перегнанным аммиаком. Лучше поставить контрольный опыт, как это указано в работе 12.

Если, например, оказались связанными аммиаком 8,6 мл 0,1 н. серной кислоты, то белковый азот сыворотки в мг% будет: $1{,}4 \times 8{,}6 \times 100 = 1204$ мг%, или 1,20 г в 100 мл. Для того, чтобы пересчитать найденное содержание азота на содержание белка

в сыворотке, умножают полученную цифру на 6,25 (так как содержание азота в сывороточных белках близко к 16%, а 100/16 = =6,25). Таким образом, содержание белка в 100 мл сыворотки будет 1,20×6,25=8,50 г, или 8,50%. В норме кровь содержит около 16—21% белка, а сыворотка — 7—9% белка.

По разности между величиной общего азота (см. работу 134) и найденной величиной для белкового азота можно определить остаточный азот в сыворотке. Очевидно, остаточный азот составит 1232—1204=28 мг%. Остаточный азот обычно определяется прямым путем, после осаждения и удаления белков и минерализации полученного фильтрата (см. работы 137 и 138).

Работа 136. **Рефрактометрическое определение белков сыворотки крови**

Способ определения белкового азота, описанный в предыдущей работе и основанный на осаждении белка и определении азота после минерализации, является общим методом. В отдельных случаях для определения белков могут быть применены и другие частные методы. Одним из таких методов является рефрактометрический способ.

Пользуясь рефрактометром Аббе (работа 73), определяют показатель преломления сыворотки при 17,5°. Показатель преломления сыворотки представляет собою сумму: 1) показателя преломления дестиллированной воды — $n_D^{17,5°}=1,33320$, 2) показателя преломления, обусловленного веществами небелкового характера (их обычно в сыворотке в шесть-семь раз меньше, чем белков) — $n_D^{17,5°}=0,00277$ и 3) показателя преломления, относящегося за счет белков сыворотки. Увеличение содержания сывороточных белков на 1% повышает показатель преломления на 0,00172 (при 17,5°), поэтому содержание белков в сыворотке в процентах, очевидно, будет:

$$p\% = \frac{n_D^{17,5°} - (1,33320 + 0,00277)}{0,00172},$$

где $n_D^{17,5°}$ — показатель преломления, найденный для исследуемой сыворотки.

Сравнивают результат рефрактометрического определения белков с результатом, полученным при определении белка в работе 135.

Для перевода показателя преломления в % белка можно пользоваться следующей таблицей:

Таблица 17

Таблица для перевода показателя преломления в проценты белка

Показатель преломления	Белки сыворотки крови (в %)	Показатель преломления	Белки сыворотки крови (в %)
1,33705	0,63	1,34575	5,68
1,33743	0,86	1,34612	5,90
1,33781	1,08	1,34650	6,12
1,33820	1,30	1,34687	6,34
1,33858	1,52	1,34724	6,55
1,33896	1,74	1,34761	6,77
1,33934	1,96	1,34798	6,98
1,33972	2,18	1,34836	7,20
1,34010	2,40	1,34873	7,42
1,34048	2,62	1,34910	7,63
1,34086	2,84	1,34947	7,85
1,34124	3,06	1,34984	8,06
1,34162	3,28	1,35021	8,28
1,34199	3,50	1,35058	8,49
1,34237	3,72	1,35095	8,71
1,34275	3,94	1,35132	8,92
1,34313	4,16	1,35169	9,14
1,34350	4,38	1,35205	9,35
1,34388	4,60	1,35242	9,57
1,34426	4,81	1,35279	9,78
1,34463	5,03	1,35316	9,99
1,34500	5,25	1,35352	10,20
1,34537	5,47	1,35388	10,41

Работа 137. Определение небелкового (остаточного) азота в сыворотке по Культюгину

После осаждения и удаления белков безбелковый центрифугат минерализуется нагреванием с серной кислотой и перекисью водорода. Образовавшийся аммиак дает с реактивом Несслера характерное желтое окрашивание. Интенсивность окраски сравнивается в колориметре с окраской стандартного раствора с известным содержанием аммиака. Очевидно, что при равной интенсивности окраски поля зрения в колориметре, концентрация исследуемого раствора C и концентрация стандартного раствора C_0 обратно пропорциональны высотам измеряемых в колориметре слоев H и H_0 и, следовательно, неизвестная концентрация:

$$C = \frac{H_0}{H} C_0$$

Растворы при относительно высоких концентрациях аммиака дают с реактивом Несслера темный осадок и, следовательно, колориметрирование возможно лишь в разбавленных растворах. Поэтому стандартные растворы готовятся так, чтобы 1 мл отвечал

0,05 мг или 0,1 мг азота. Для приготовления таких растворов берется навеска химически чистого высушенного в эксикаторе сернокислого аммония: для раствора с содержанием в 1 мл 0,05 мг азота — 235,7 мг на 1000 мл воды, а для раствора с содержанием в 1 мл 0,1 мг азота — 471,6 мг на 1000 мл воды. Колориметрирование должно вестись так, чтобы не было слишком резкой разницы в окраске испытуемого и стандартного раствора, т. е. таким образом, чтобы высота столбов жидкости в колориметре различалась, примерно, в полтора раза. При большей разнице сравнение окрасок обычно не бывает точным.

Минерализация ведется без добавки сернокислой меди в качестве катализатора ввиду того, что медь даже в очень малых концентрациях (выше 3 мг на 1 мл) дает помутнение с реактивом Несслера, препятствующее колориметрированию.

0,3 мл сыворотки крови помещают в центрифужную пробирку, добавляют 2,7 мл раствора фосфорномолибденовой кислоты для осаждения белков (общий объем смеси 3,0 мл). Жидкость встряхивают и оставляют на 20—30 минут, после чего центрифугируют. Отбирают 1 мл прозрачного раствора (соответствует 0,1 мл сыворотки), свободного от белков, и переносят в пробирку из хорошего стекла. Добавляют туда же 3 капли концентрированной серной кислоты и нагревают на слабом огне. Вода испаряется и жидкость буреет. Параллельно в другой пробирке для контроля совершенно также нагревают 3 капли серной кислоты, причем потемнения раствора не должно наблюдаться. По охлаждении в обе пробирки добавляют по 3—5 капель пергидрола и нагревают снова до полного обесцвечивания в пробирке с центрифугатом сыворотки. Охлаждают, разбавляют содержимое пробирок 2—3 мл воды и переводят в две мерные колбы на 50 мл. Пробирки споласкивают водой, которую также выливают в колбы (общий объем, примерно, 15 мл). Прибавляют в обе колбы по 0,5 мл 50%-ного раствора едкого натра, не содержащего аммиака, и по 0,5 мл реактива Несслера (I модификация). Затем в колбу с контрольным опытом вносят 1 мл стандартного раствора сернокислого аммония (1мл =0,05 мг азота) и жидкость в колбах доводят до метки водой. После этого колориметрируют в колориметре Дюбоска. Результат, выраженный в мг% азота, находят следующим образом:

$$\frac{0{,}05 \cdot H_0 \cdot 100}{H \cdot 0{,}1} = \text{мг } \% \text{ азота}$$

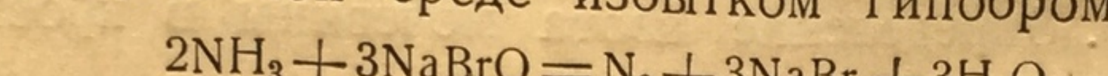
Если, например, в результате колориметрирования найдено, что отношение высот слоев стандартного раствора к испытуемому $^2/_3$, то остаточного азота в исследуемой сыворотке:

$$\frac{0{,}05 \cdot 100 \cdot 2}{0{,}1 \cdot 3} = 33{,}3 \text{ мг}\%$$

В норме остаточный азот сыворотки составляет 20—40 мг %.

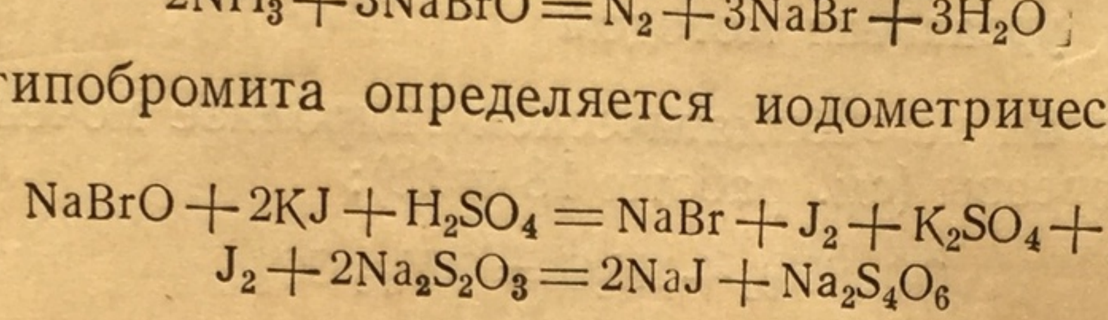
Работа 138. **Определение небелкового (остаточного) азота сыворотки крови по Энгельгардту и Любимовой**

После осаждения белков сыворотки трихлоруксусной кислотой безбелковый центрифугат минерализуется нагреванием с серной кислотой, без добавки катализатора. Образовавшийся аммиак окисляют в щелочной среде избытком гипобромита натрия:



$$2NH_3 + 3NaBrO = N_2 + 3NaBr + 3H_2O$$

Избыток гипобромита определяется иодометрически по уравнениям:



$$NaBrO + 2KJ + H_2SO_4 = NaBr + J_2 + K_2SO_4 + H_2O$$

$$J_2 + 2Na_2S_2O_3 = 2NaJ + Na_2S_4O_6$$

По количеству определяемого титрованием с тиосульфатом иода находят количество пошедшего на окисление гипобромита, которое пересчитывается на азот. При этом необходим параллельный контрольный опыт без сыворотки или крови для определения всего количества взятого гипобромита.

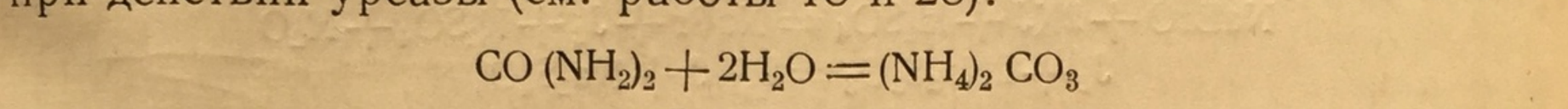
В центрифужную пробирку отмеривают точно 2,9 мл дестиллированной воды и затем 0,1 мл крови или сыворотки и 1,0 мл 30% трихлоруксусной кислоты для осаждения белков. После центрифугирования отбирают 2,0 мл прозрачного центрифугата, которые соответствуют 0,05 мл взятой крови или сыворотки и переносят в микрокьельдалевскую колбу или пробирку. В другую колбу для контрольного опыта вносят 2 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты. Затем в обе колбы добавляют по 1 мл 50%-ной H_2SO_4 и нагревают на пламени до полного испарения воды. После этого увеличивают нагревание и продолжают минерализацию до полного обесцвечивания жидкости, на что уходит около 15—20 минут. По охлаждении добавляют по каплям 5 мл дестиллированной воды и охлаждают. В обе колбы добавляют по 2—3 капли 1%-ного раствора конго или метилрот и точно нейтрализуют, добавляя из бюретки 2 н. раствор едкого натра (расходуется около 9 мл). Смесь охлаждают и прибавляют точно 1 мл раствора гипобромита (готовится смешением при хорошем охлаждении 120 мл 5%-ного едкого натра, 1 мл брома и воды до 375 мл и из этого основного раствора перед опытом берут 5 мл и добавляют 45 мл 0,1 н. едкого натра), оставляют на 10 минут, после чего добавляют 0,5 мл свежеприготовленного 5%-ного раствора иодистого калия и 1 мл 1,0 н. H_2SO_4. Через 5 минут добавляют по нескольку капель раствора крахмала и титруют из микробюретки 0,005 н. $Na_2S_2O_3$ до исчезновения синей окраски

Из числа миллилитров $Na_2S_2O_3$, израсходованных в контрольном опыте, вычитают миллилитры $Na_2S_2O_3$, пошедшие в основном опыте. Разность эквивалентна количеству израсходованного на окисление аммиака гипобромита и ее можно пересчитать в мг аммиака или мг азота. Так как 1 мл 0,005 н. $Na_2S_2O_3$ отвечает $14:3 \times 200 = 0{,}0233$ мг азота, то, умножая эту величину на число миллилитров

$Na_2S_2O_3$, деля на 0,05 и умножая на 100, узнают содержание остаточного азота в мг на 100 мл крови или сыворотки. Если, например, на окисление аммиака пошло количество гипобромита, эквивалентное 0,54 мл 0,05 н. $Na_2S_2O_3$, то содержание остаточного азота в исследуемой сыворотке будет $0{,}0233 \times 0{,}54 \times 100/0{,}05 = 31{,}6$ мг%.

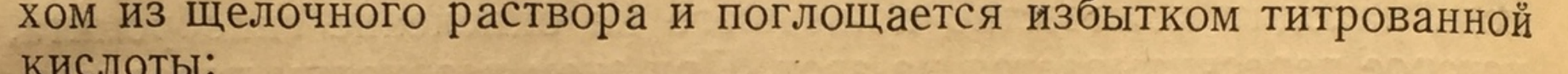
Работа 139. **Определение азота мочевины в крови уреазным методом**

Способ основан на энзиматическом гидролизе мочевины крови при действии уреазы (см. работы 18 и 28):



$$CO(NH_2)_2 + 2H_2O = (NH_4)_2CO_3$$

Образовавшийся аммиак отгоняется с просасываемым воздухом из щелочного раствора и поглощается избытком титрованной кислоты:



$$2NH_3 + H_2SO_4 = (NH_4)_2SO_4$$

Избыток кислоты оттитровывается щелочью и по разности вычисляют количество связанного азота.

Ввиду специфичности действия уреазы аммиак образуется только за счет мочевины. Однако, при таком определении допускается неточность, потому что, наряду с аммиаком, образующимся из мочевины, отгоняется и определяется также и преформированный аммиак (аммонийных солей крови). Количество последнего, правда, незначительно по сравнению с количеством аммиака мочевины. В норме кровь человека содержит 10—20 мг% азота мочевины и только около 0,1 мг% азота аммонийных солей. Кроме того, так как определение обычно ведут не осаждая белков, не исключена возможность образования некоторого количества аммиака в процессе определения, за счет белковых веществ. Следует поэтому ставить параллельно контрольный опыт, в котором берется раствор инактивированной уреазы, и результат этого опыта вычитают из результата, полученного в основном опыте.

Необходимо также обратить внимание еще на один возможный источник ошибки — на качество применяемого для определения препарата уреазы. Раствор уреазы готовится из муки бобов сои. 1 г обезжиренной муки этих бобов хорошо встряхивают с 40 мл 30%-ного спирта и отфильтровывают. Такой раствор можно хранить не более 12 часов, так как в нем постепенно накопляется аммиак.

Для определения пользуются прибором, изображенным на рис. 18 и состоящим из трех больших пробирок. В пробирку *А* наливают 50%-ной серной кислоты, которая служит для очистки просасываемого воздуха, а в пробирку *Д* отмеривают 10 мл 0,01 н. серной кислоты. Затем в пробирку *В* вводят 2 мл крови, 0,5 мл фосфатной буферной смеси (pH=7,0) и 0,5—1 мл раствора уреазы и нагревают при 50° в термостате 20 минут. Далее соединяют прибор, вводят через воронку в пробирку *В* несколько капель амило-

вого алкоголя или парафинового масла для уменьшения вспенивания и затем, присоединив прибор к водоструйному насосу, в пробирку *В* вводят 5 мл насыщенного раствора соды. Опускают пробирку *В* в водяную баню при 50° и протягивают воздух через прибор в течение 30—40 минут. Затем отъединяют пробирку *Д*, прибавляют несколько капель смешанного индикатора (метилрот и метиленблау), точно 7 мл 0,01 н. едкого натра и дотитровывают из микробюретки 0,01 н. едким натром до перехода окраски из красной в зеленую.

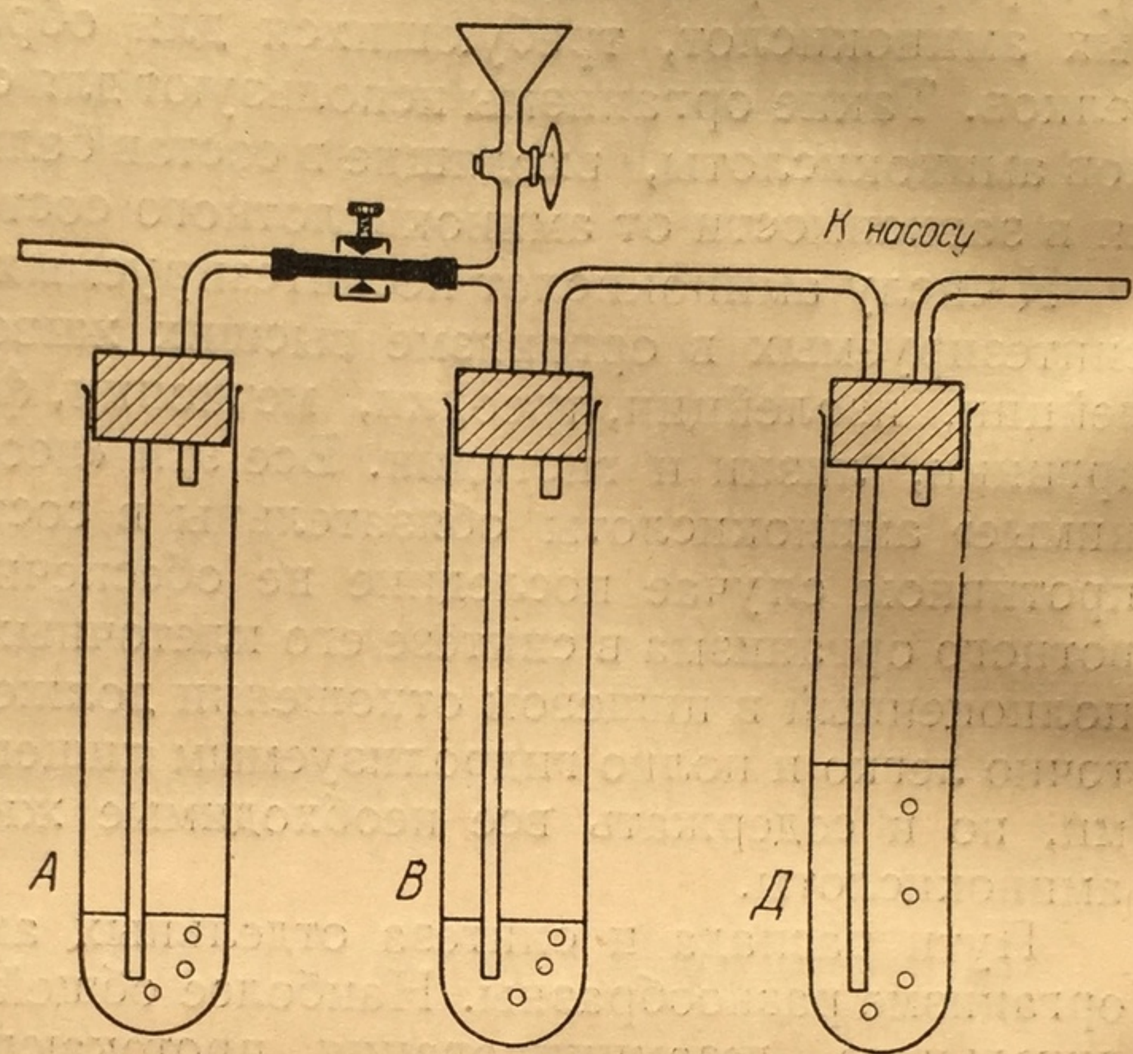


Рис. 18. Прибор для определения аммиака.

Если, например, в основном опыте было связано 1,8 мл 0,01 н. кислоты, а в контрольном опыте 0,2 мл, то аммиаком, образовавшимся из мочевины исследуемой крови, связано 1,8 — 0,2 = 1,6 мл кислоты. Каждый мл 0,01 н. раствора кислоты отвечает 0,14 мг азота. Следовательно, азот мочевины $1{,}6 \times 0{,}14 \times \times 100/2 = 11{,}2$ мг%. Можно выразить результат определения в мг% мочевины, имея в виду, что каждый миллилитр 0,01 н. раствора кислоты отвечает 0,3 мг мочевины.

Азот мочевины — главная часть остаточного азота крови и составляет около 50%, а иногда и более, всего остаточного азота.

ОБМЕН БЕЛКОВ И КОНЕЧНЫЕ ПРОДУКТЫ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА

В основе жизнедеятельности всякого организма лежат непрерывные процессы распада (диссимиляции) белков его клеток и тканей. Это непрерывное «изнашивание» клеточного белка требует столь же непрерывного пополнения путем синтеза новых количеств белковых веществ.

У животных, кроме того, происходят постоянные потери значительного количества белков при образовании различных секретов пищеварительного канала и при отторжении белков в виде слущенного эпителия поверхностных покровов, волос и т. д. Все эти потери белков компенсируются в организме непрерывным образованием их из аминокислот.

У автотрофных растительных организмов все аминокислоты, необходимые для образования белков из клеток, синтезируются

за счет безазотистых веществ (углеводов), образующихся при ассимиляции угольной кислоты, и азота неорганических соединений (аммонийных солей и нитратов), заимствуемых организмами автотрофов из внешней среды. В противоположность автотрофам, гетеротрофные организмы животных не способны к синтезу некоторых аминокислот, требующихся для образования их клеточных белков. Такие организмы используют для синтеза собственных белков аминокислоты, входящие в состав белков их пищи, и находятся в зависимости от аминокислотного состава пищевого белка.

К числу аминокислот несинтезируемых или слишком медленно синтезируемых в организме высших животных относятся: валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, фенилаланин, триптофан, аргинин, лизин и гистидин. Все эти «необходимые» или «незаменимые» аминокислоты обязательны в составе пищевых белков, в противном случае последние не обеспечивают потребностей животного организма в синтезе его клеточных белков. Поэтому белок полноценный в пищевом отношении должен не только быть достаточно легко и полно гидролизуемым пищеварительными ферментами, но и содержать все необходимые животному «незаменимые» аминокислоты.

Пути распада и синтеза отдельных аминокислот в животном организме разнообразны. Наиболее общей является реакция окислительного дезаминирования, протекающая в тканях аэробно, с образованием из α-аминокислот α-кетокислот. При этом оксидазы l-α-аминокислот катализируют реакцию аэробного дегидрирования l-α-аминокислот:

$$CH_3-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH+[\Phi]\rightleftarrows CH_3-\underset{\underset{NH}{\|}}{C}-COOH+[\Phi H_2]$$

$$[\Phi H_2]+O_2=[\Phi]+H_2O_2$$

а образовавшиеся α-иминокислоты далее, с отщеплением аммиака, превращаются в α-кетокислоты:

$$CH_3-\underset{\underset{NH}{\|}}{C}-COOH+H_2O=CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COOH+NH_3$$

Сходным образом, при действии глициноксидазы гликоколл превращается в аммиак и глиоксиловую кислоту, которая далее окисляется в щавелевую:

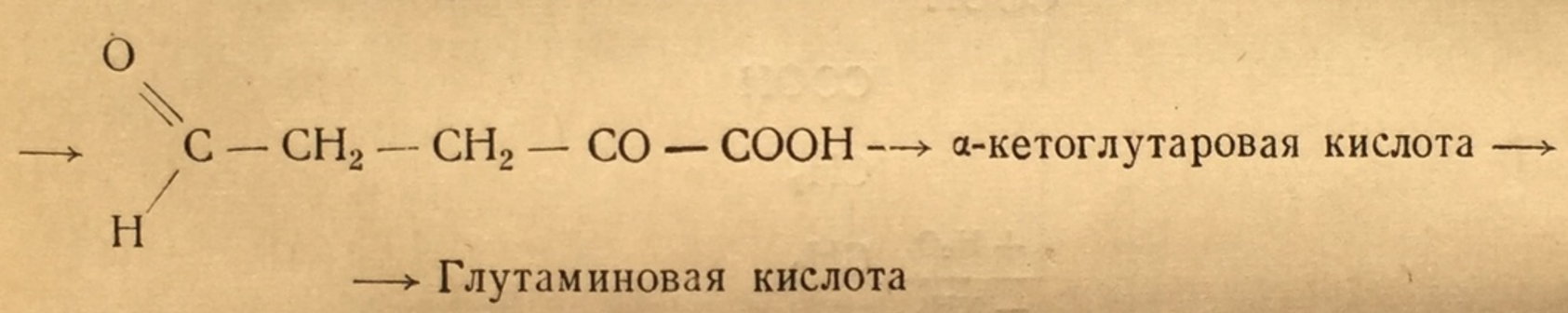
$$\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH_2}-COOH+O_2+H_2O=\begin{matrix} O \\ \| \\ C-COOH \\ / \\ H \end{matrix}+NH_3+H_2O_2$$

$$\downarrow +O$$

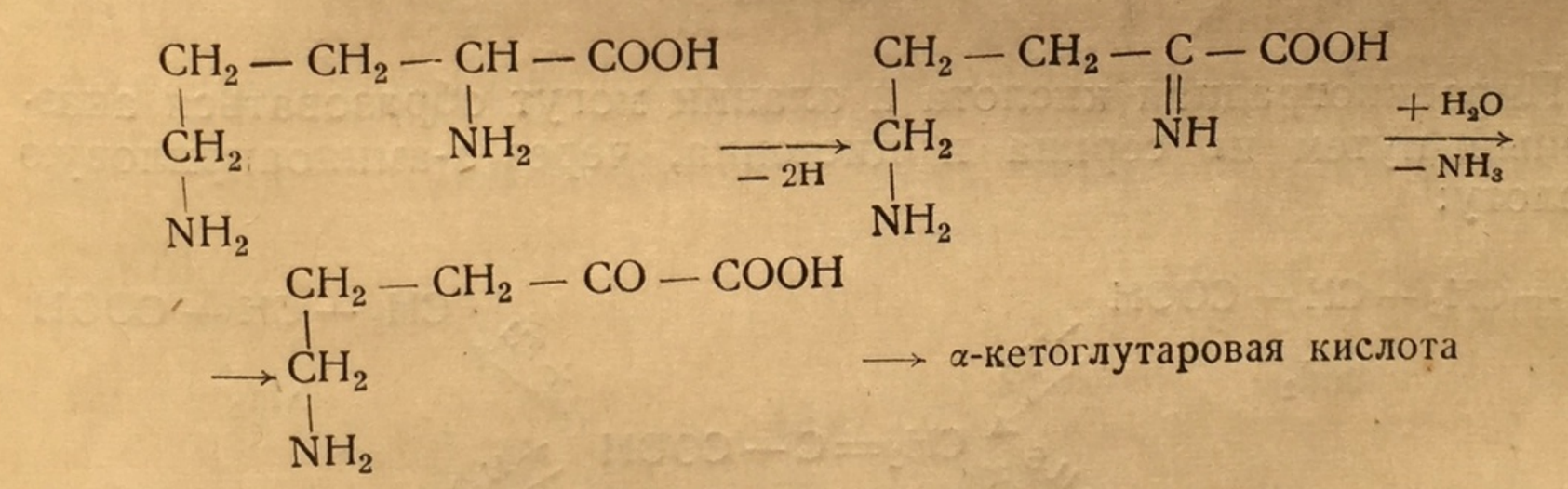
$$\begin{matrix} COOH \\ | \\ COOH \end{matrix}\xrightarrow{+O} CO_2+H_2O$$

При окислительном дезаминировании из аланина образуется пировиноградная кислота, из глутаминовой кислоты — α-кетоглутаровая, а из аспарагиновой — щавелевоуксусная кислота, т. е. промежуточные продукты обмена, общие обмену углеводов и жиров, связывающие обмен аминокислот с цепью реакций цикла трикарбоновых кислот.

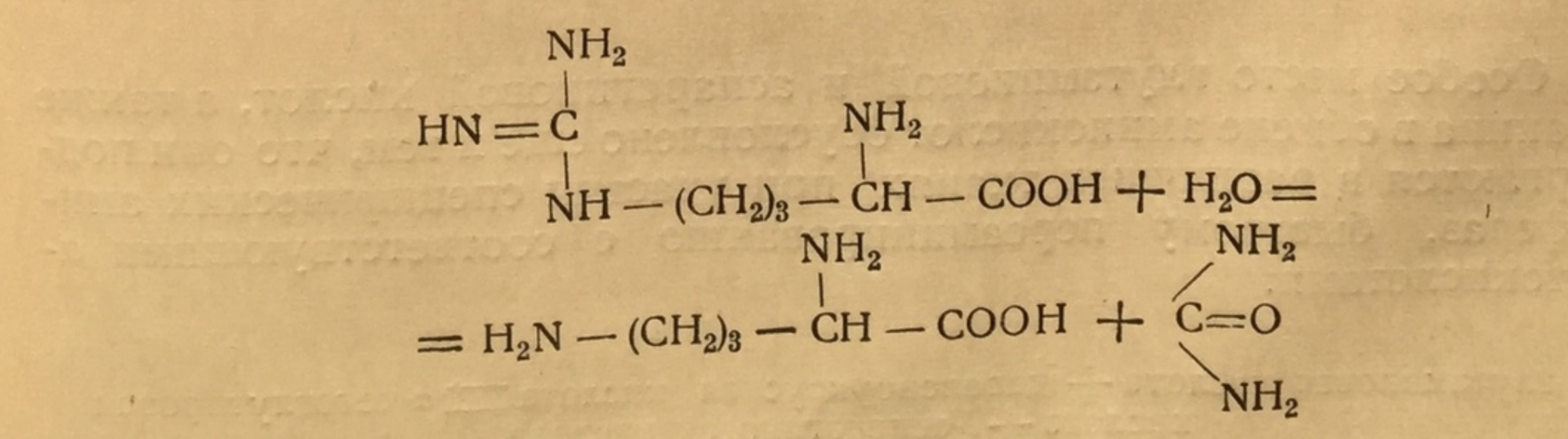
α-Кетоглутаровая и глутаминовая кислоты образуются также при окислительном дезаминировании пролина и оксипролина:



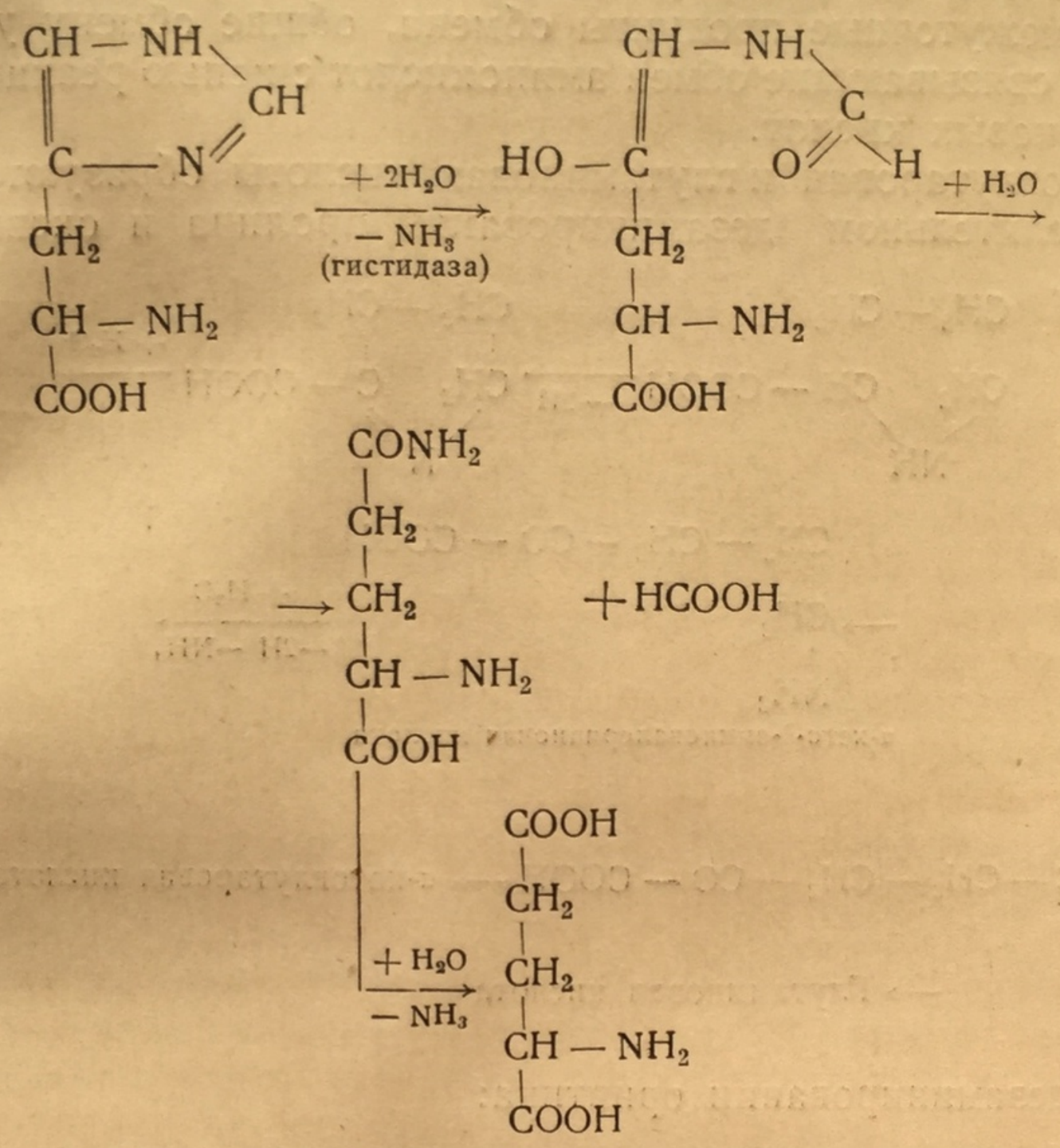
и при дезаминировании орнитина:



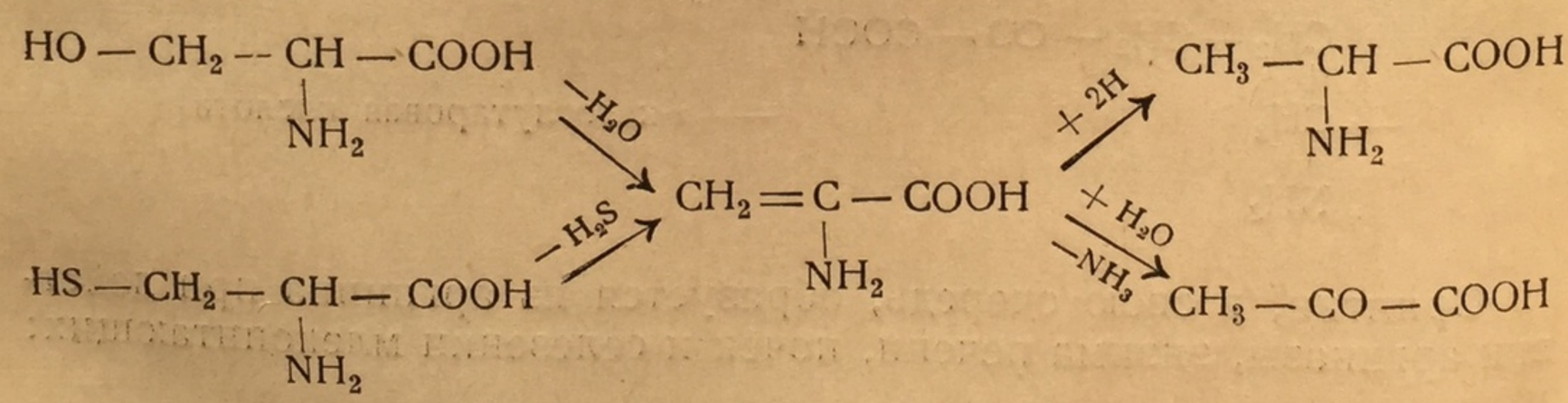
Орнитин, в свою очередь, образуется из аргинина при действии аргиназы, энзима печени, почек и селезенки млекопитающих:



Глутаминовая кислота образуется, далее, при энзиматическом расщеплении гистидина в печени при действии гистидазы:



Пировиноградная кислота и аланин могут образоваться анаэробным путем из серина и цистеина, через α-аминоакриловую кислоту:



Особое место глутаминовой и аспарагиновой кислот, а также аланина в обмене аминокислот обусловлено еще и тем, что они подвергаются в различных тканях при участии специфических аминофераз, быстрому переаминированию с соответствующими α-кетокислотами:

l-глутаминовая кислота + щавелевоуксусная кислота $\rightleftarrows$ α-кетоглутаровая кислота + *l*-аспарагиновая кислота.

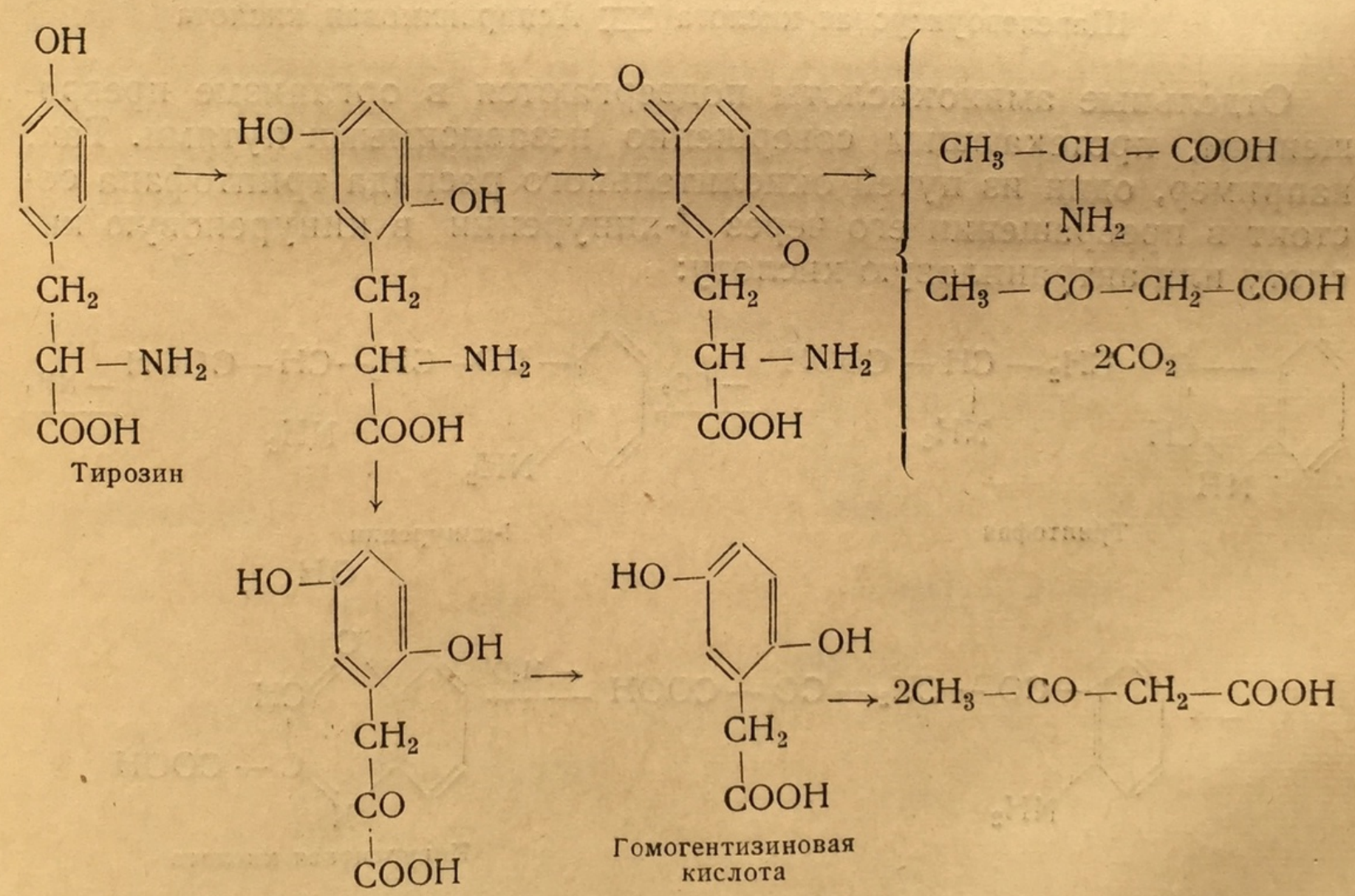
l-аспарагиновая кислота + пировиноградная кислота $\rightleftarrows$ щавелевоуксусная кислота + l-аланин

l-аланин + α-кетоглутаровая кислота $\rightleftarrows$ пировиноградная + l-глутаминовая кислота.

Этот процесс переаминирования, открытый и подробно изученный советскими учеными лауреатами Сталинской премии А. Браунштейном и М. Крицман, является важным этапом обмена аминокислот.

Реакции переаминирования и дезаминирования являются теми реакциями обмена, которые лежат как на пути окислительного распада аминокислот, так и синтеза некоторых из них из безазотистых продуктов обмена и аммиака.

Иной путь окислительного распада наблюдается для таких аминокислот как лейцин, изолейцин, фенилаланин и тирозин. При окислении в печени лейцина и изолейцина, начинающемся также с окислительного дезаминирования, образуется ацетоуксусная кислота. Фенилаланин окисляется вначале в тирозин, который далее подвергается своеобразному окислительному распаду также с образованием ацетоуксусной кислоты или аланина и ацетоуксусной кислоты:



Таким образом, обмен этих аминокислот может быть связан как с реакциями цикла трикарбоновых кислот, так и с обменом жиров (через ацетоуксусную кислоту).

Связь основных этапов обмена аминокислот с обменом углеводов и жиров изображает следующая схема:

Углеводы

Серин
Аланин ⇄ $CH_3-CO-COOH$
Цистеин

+

Жиры

$CH_3-CO-CH_2-COOH$

Лейцин
Изолейцин

Тирозин

+

Щавелевоуксусная кислота

Фенилаланин

cis-Аконитовая кислота

Гистидин

α-Кетоглутаровая кислота ⇄ Глутаминовая кислота

Янтарная кислота

Пролин
Оксипролин
Орнитин

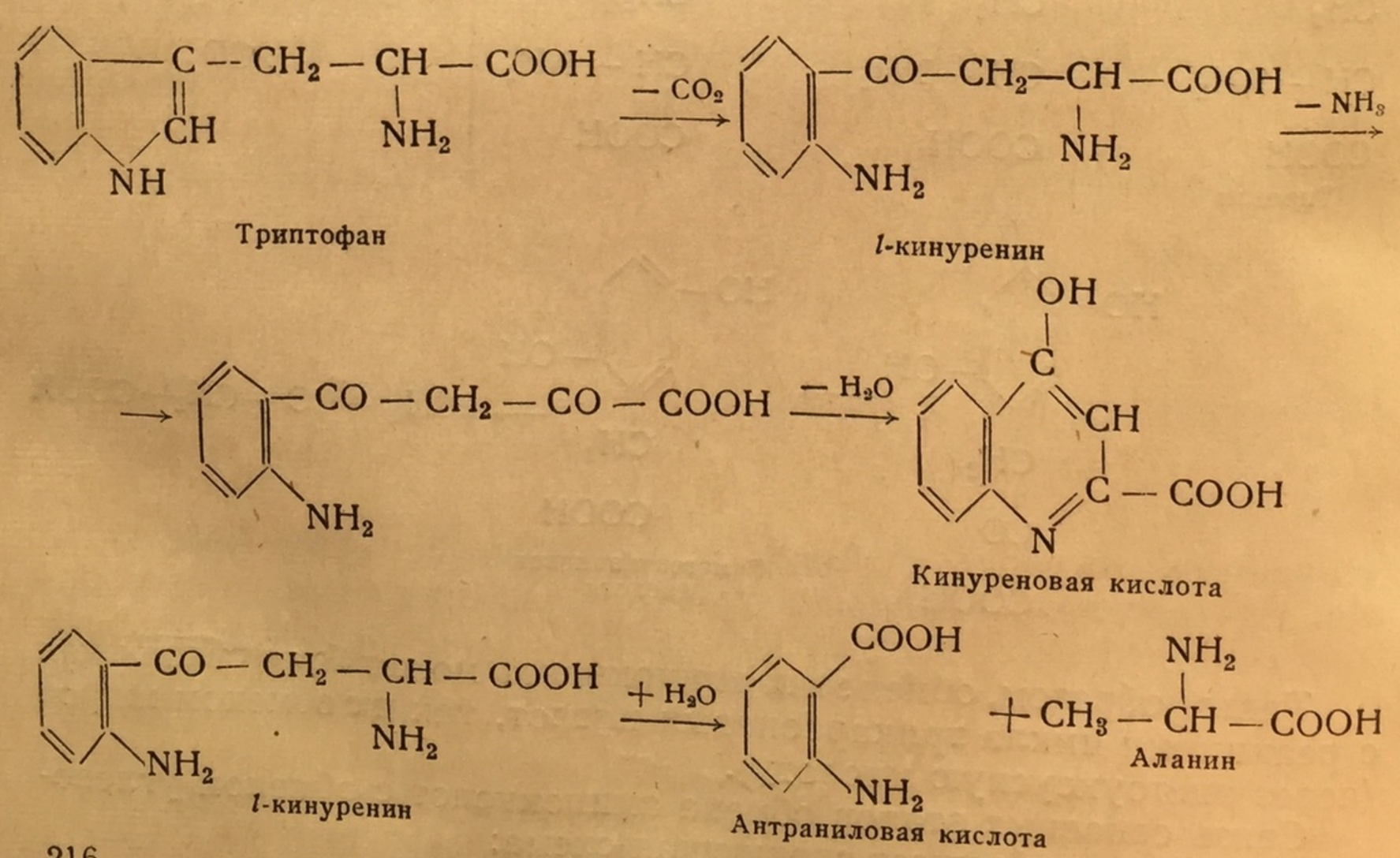
Фумаровая кислота

Яблочная кислота

Аргинин

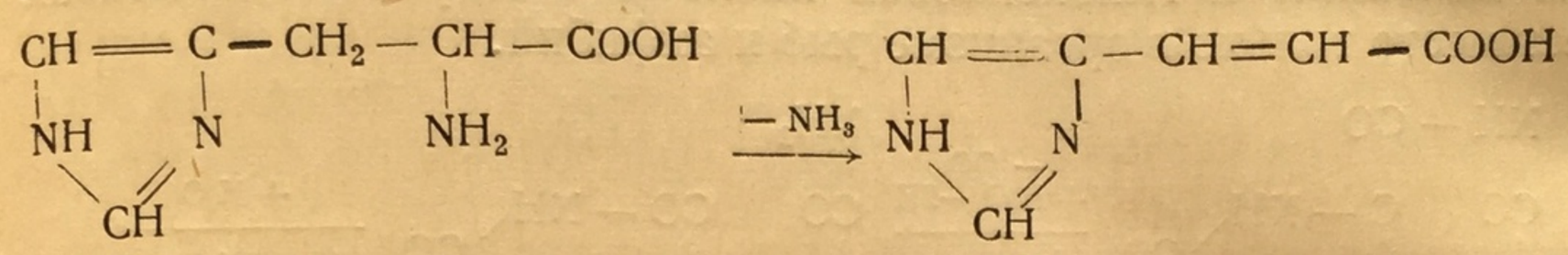
Щавелевоуксусная кислота ⇄ Аспарагиновая кислота

Отдельные аминокислоты подвергаются в организме превращениям, протекающим совершенно независимыми путями. Так, например, один из путей окислительного распада триптофана состоит в превращении его через *l*-кинуренин в кинуреновую кислоту или антраниловую кислоту:

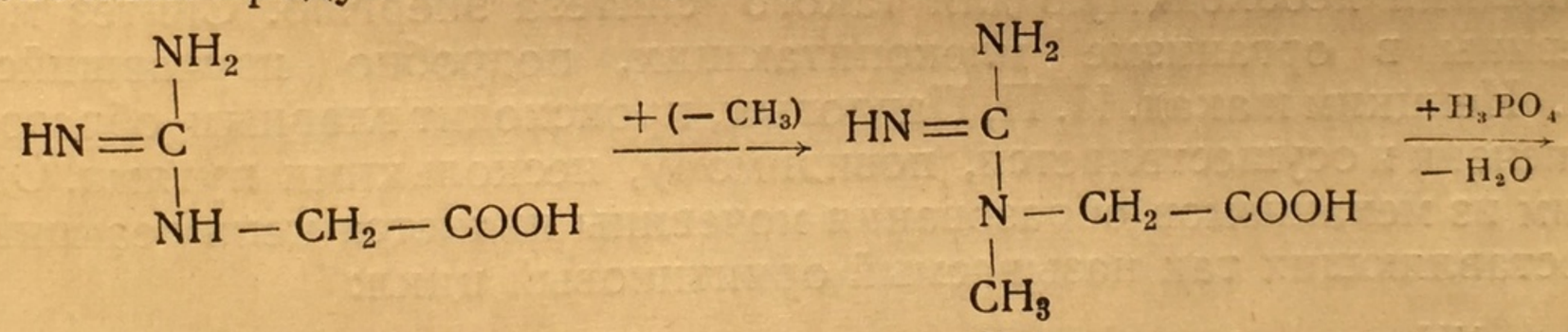


которые у некоторых животных являются нормальными конечными продуктами обмена, у других — подвергаются дальнейшему окислению.

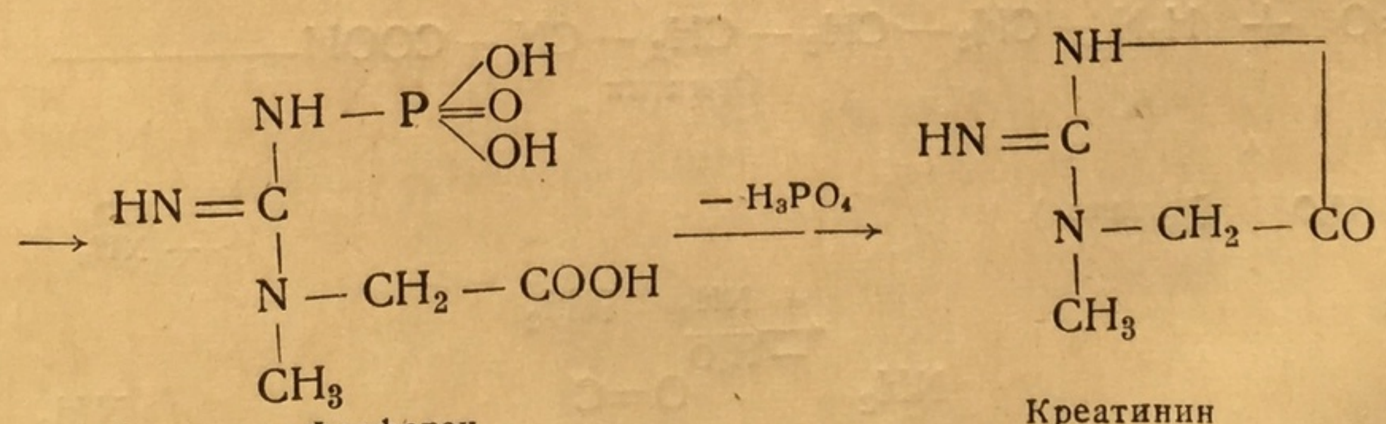
Многие аминокислоты, кроме уже указанных выше реакций, вступают в целый ряд других реакций обмена. Гистидин не только превращается при действии гистидазы в глутаминовую кислоту, но частично распадается в организме гомойотермных животных через уроканиновую кислоту:



Из гистидина в организме образуются эрготионеин, карнозин, ансерин, а путем декарбоксилирования — физиологически активный гистамин, который далее окисляется при действии диаминоксидазы (гистаминазы). Тирозин декарбоксилируется в тирамин (окисляющийся далее при действии тираминоксидазы), превращается в надпочечниках в гормон адреналин, а при иодировании в щитовидной железе переходит в дииодтирозин и тироксин (см. работы 5 и 120). Цистеин частью превращается в таврин, который выделяется в составе желчи в виде парных соединений с желчными кислотами. Аргинин реагирует с глицином, причем образуются орнитин и гликоциамин. Гликоциамин метилируется (при участии метионина) в креатин, который превращается в фосфаген. При распаде фосфагена образуется креатинин, являющийся нормальным конечным продуктом обмена, выделяемым с мочой:



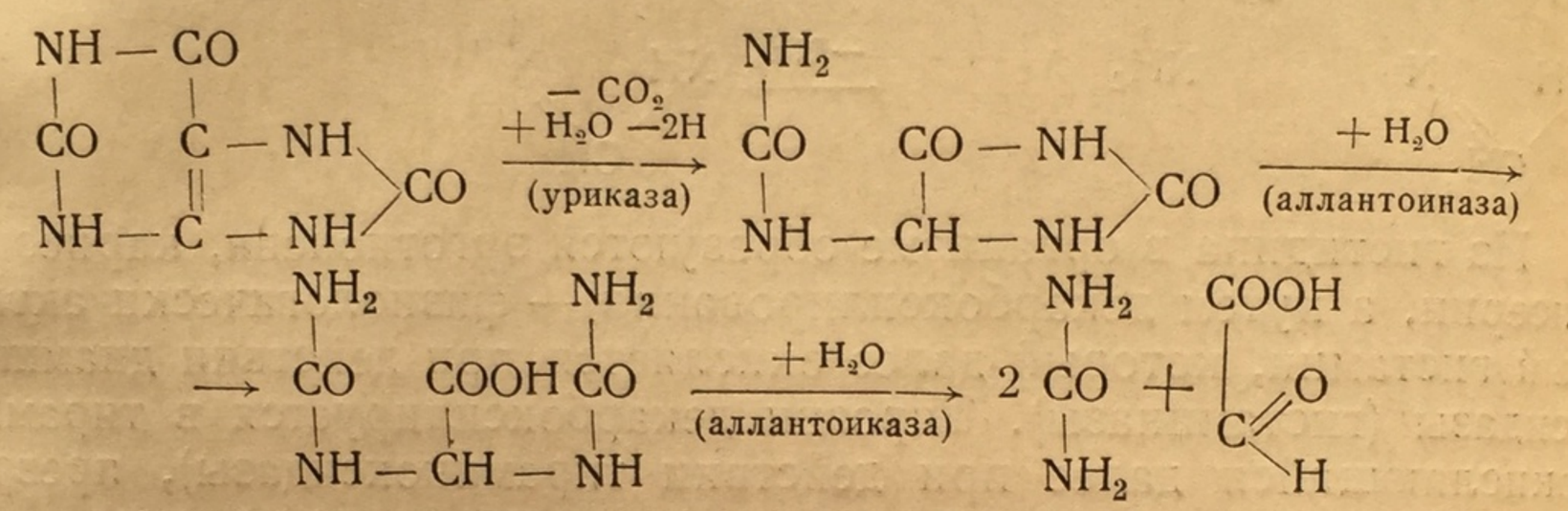
Гликоциамин Креатин



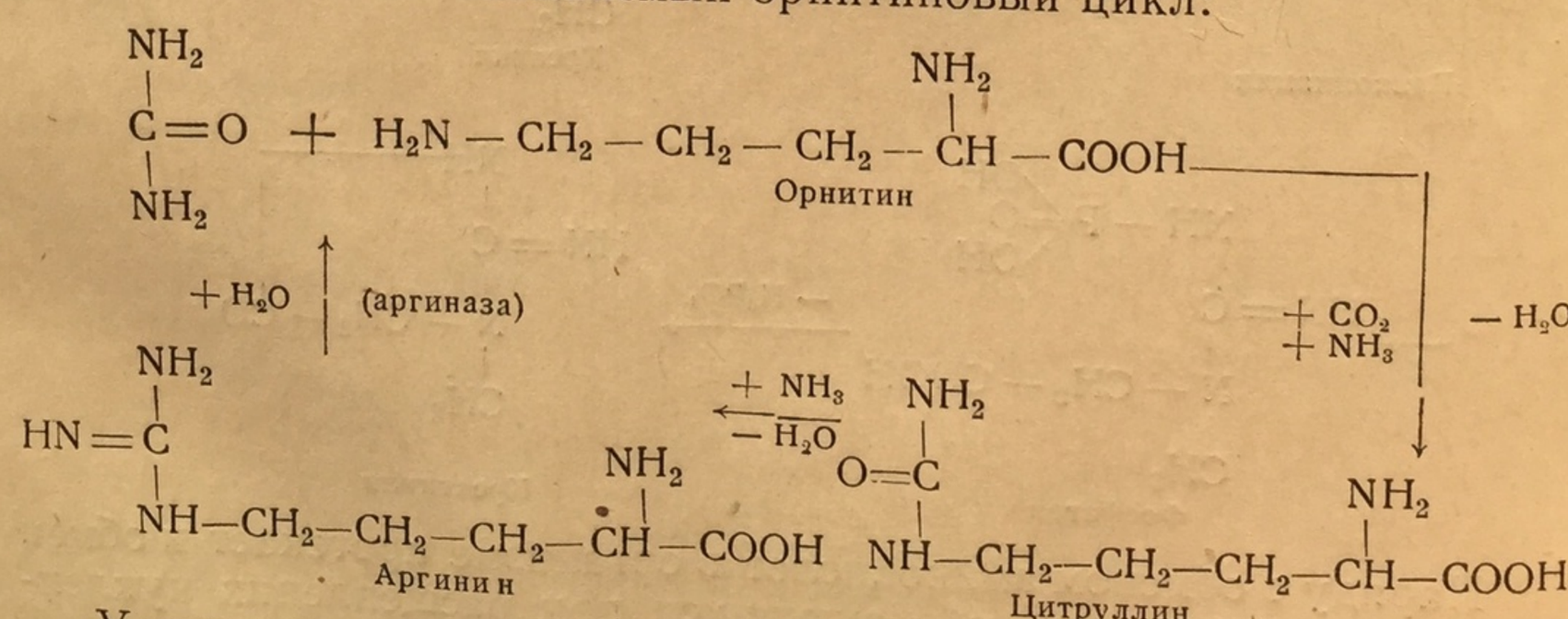
Фосфаген Креатинин

Наряду с обменом аминокислот в организме протекает и обмен пуриновых оснований, образующихся при расщеплении нуклеиновых кислот. Аминопурины — аденин и гуанин — дезаминируются в оксипурины — гипоксантин и ксантин, окисляющиеся далее (см. работу 35) в мочевую кислоту. Мочевая кислота являет-

ся главным конечным продуктом пуринового обмена у человека и антропоидов. У большинства млекопитающих, в печени которых имеется активная уриказа, мочевая кислота в большей своей части окисляется в аллантоин. Аллантоин, образующийся и выделяющийся у человека лишь в незначительных количествах, является, таким образом, у млекопитающих главным конечным продуктом пуринового обмена. Дальнейший распад аллантоина с образованием мочевины и глиоксиловой кислоты в широких масштабах имеет место только в организме рыб и амфибий.



Аммиак, образующийся при дезаминировании аминокислот (и, отчасти, дипептидов), при дезаминировании аминопуринов в оксипурины и при других реакциях обмена аминокислот и биогенных аминов у человека и млекопитающих животных в норме почти весь превращается в мочевину (см. работу 144), которая и выделяется, как главный конечный продукт белкового обмена. Синтез мочевины из аммиака и угольной кислоты связан с затратой энергии и в организме сопряжен с окислительными реакциями, дающими необходимую для такого синтеза энергию. Синтез мочевины в организме млекопитающих, подробно изучавшийся М. Ненцким и акад. И. П. Павловым, происходит главным образом в печени и осуществляется, повидимому, несколькими путями. Одним из механизмов образования мочевины является цепь реакций, составляющих так называемый орнитиновый цикл:



У птиц и рептилий аммиак, образующийся при обмене аминокислот и белка, почти полностью превращается не в мочевину, а в мочевую кислоту, мочевина же выделяется в незначительных количе-

ствах, что, вероятно, отчасти связано с отсутствием в печени у большинства этих животных аргиназы. У тех рептилий, печень которых содержит аргиназу, образуется наряду с мочевой кислотой значительное количество мочевины. Мочевина, образующаяся у птиц, является, повидимому, продуктом обмена одной аминокислоты — аргинина.

Высшие животные выделяют азотистые продукты обмена, главным образом, с мочой через почки и в незначительном количестве азот выделяется кожей и с калом. Так, например, у человека за сутки выводится в среднем около 14 г азота, из которых 12,5 г выделяются в виде азотистых веществ мочи, 1,0 г азота выделяется с калом и 0,5 г азота — с потом. Изменения в интенсивности азотистого обмена сказываются преимущественно на выделении азота с мочой и поэтому определение общего количества азота, выводимого с мочой, дает представление об интенсивности белкового обмена в организме. С другой стороны, определение отдельных фракций азота мочи, т. е. отдельных азотистых веществ, составляющих общий азот мочи, имеет существенное значение для суждения о направлении и интенсивности отдельных фаз азотистого обмена.

Таблица 18 дает среднее суточное выведение общего азота и отдельных фракций азота в нормальной моче человека.

Таблица 18

Главные фракции азота мочи

Фракции азота мочи человека	Грамм *N*	В % к общему *N*	Грамм вещества
Общий азот	12,5	100	—
Мочевина	10,5	85	22
Креатинин	0,55	4,5	1,3
Аммиак	0,57	4,5	0,7
Аминокислоты	0,50	4,0	—
Мочевая кислота	0,23	2,0	0,7
Пурины	—	—	0,02
Гиппуровая кислота	0,055	0,4	0,7
Гистидин и другие производные имидазола	—	—	0,3
Гликоциамин	0,01	0,08	0,03
Аллантоин	0,01	0,08	0,03
Индикан	—	—	0,01

Нормальная моча практически свободна от белков. Строго говоря, во всякой нормальной моче содержатся следы белка в количестве, не обнаруживаемом обычными реактивами. Присутствие в моче муциноподобных веществ бывает заметно по образованию при стоянии свежевыпущенной мочи легкого «облачка».

Работа 140. **Определение общего азота мочи по Кьельдалю**

Метод основан на полной минерализации органических веществ мочи, отгонке аммиака и поглощении его титрованной кислотой.

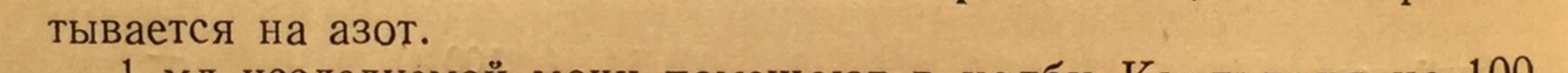
5 мл мочи при помощи пипетки помещают в колбу Кьельдаля емкостью 200 мл. Добавляют 0,5 г сернокислой меди, 3 г сернокислого калия и 15 мл концентрированной серной кислоты. Нагревают, вначале осторожно, смесь при кипении до исчезновения буроватой, а затем желтоватой окраски. После часового нагревания минерализация обычно закончена. В дальнейшем следуют методу, изложенному в работе 12.

Результат определения выражают в мг или г азота на 100 мл мочи и вычисляют суточное выведение азота с мочой.

В норме суточное выделение азота с мочой у человека составляет 9—15 г.

Работа 141. **Определение общего азота мочи по Иохельсону**

Метод основан на минерализации органических веществ мочи, в результате чего весь азот, превращаясь в аммиак, связывается в виде сернокислого аммония. Полученный таким способом раствор обрабатывается нейтрализованным раствором формальдегида, причем протекает следующая реакция:



$$2(NH_4)_2SO_4 + 6HCOH = (CH_2)_6N_4 + 2H_2SO_4 + 6H_2O.$$

Вытесненная из сернокислого аммония в результате образования гексаметилентетрамина серная кислота титруется 0,1 н. едкой щелочью и количество пошедшей на титрование щелочи пересчитывается на азот.

1 мл исследуемой мочи помещают в колбу Кьельдаля на 100 мл, добавляют 1 г сернокислого калия и 1 мл концентрированной серной кислоты (уд. веса 1,84) и нагревают при умеренном кипении до полного обесцвечивания жидкости. Полное окисление обычно заканчивается в 15—20 минут. По охлаждении содержимое колбы переносят в колбу для титрования, споласкивая 20 мл воды. Добавляют 5 капель смешанного индикатора (0,05 г метилрот и 1 г фенолфталеина растворяют в 60 мл спирта и доводят водой до 100 мл) и избыток серной кислоты нейтрализуют, добавляя по каплям 10%-ный раствор едкого натра (свободного от карбонатов) до перехода окраски от розовой к желтой (pH =4,4—6,2). На эту операцию расходуется, примерно, 12—13 мл раствора едкой щелочи. Затем точно дотитровывают жидкость 0,1 н. раствором едкого натра (свободного от карбонатов) до слаборозового (фиолетового) окрашивания от фенолфталеина (pH =8,3—10,0). Теперь к нейтрализованной жидкости добавляют 10 мл 30—40% формалина, предварительно нейтрализованного добавлением 0,1 н. едкого натра до

розовой окраски по фенолфталеину. При добавлении формалина выделяется свободная серная кислота, розовая окраска фенолфталеина исчезает и жидкость окрашивается в розовый цвет метилротом. Титруют жидкость 0,1 н. раствором едкого натра до розовой (слабофиолетовой) окраски фенолфталеина. Израсходованное на это титрование количество 0,1 н. щелочи пересчитывают на азот, имея в виду, что каждый миллилитр точно 0,1 н. раствора щелочи отвечает 0,0014 г азота. Вычисляют содержание азота в 100 мл мочи и во всем объеме суточной мочи.

Если, например, на титрование, после добавления формалина, пошло 6,0 мл 0,1 н. едкого натра, то в 1 мл исследуемой мочи содержится $6{,}0 \cdot 0{,}0014$ г, а в 100 мл мочи $6{,}0 \cdot 0{,}14 = 0{,}84$ г азота. Если объем суточной мочи 1500 мл, то за сутки выводится 12,6 г азота.

Работа 142. **Получение мочевины из мочи**

Мочевина составляет главную часть экскретируемого с мочой азота. Азот мочевины составляет у человека около 85% общего азота мочи и даже при бедной белками пище не спускается ниже 65%. Суточное выведение мочевины у человека около 25 г, а содержание ее в моче около 2%. Содержание мочевины в крови 0,01—0,03%, и поэтому высокая концентрация мочевины в моче достигается лишь в результате сложного процесса ультрафильтрации и обратного всасывания, происходящих в почечных канальцах.

100 мл мочи упаривают на водяной бане до консистенции сиропа, после чего добавляют 20 мл спирта и перемешивают. Горячий спиртовый экстракт фильтруют, фильтрат хорошо охлаждают льдом и при помешивании к нему добавляют азотную кислоту (2:1) до прекращения выпадения осадка азотнокислой мочевины. Через один-два часа осадок отсасывают на фарфоровой воронке и отжимают на листе фильтровальной бумаги. Затем в фарфоровой чашке осадок смешивают с 10 мл спирта и добавляют сухого углекислого бария до прекращения выделения CO_2 при нагревании на водяной бане. После разложения азотнокислой соли добавляют животный уголь и выпаривают досуха. Сухой остаток извлекают 10 мл горячего спирта, фильтруют и фильтрат упаривают и охлаждают. Выпавшие кристаллы мочевины отсасывают, отжимают и высушивают. Определяют температуру плавления (132°) и проделывают биуретовую пробу, для чего кристаллы мочевины нагревают в сухой пробирке до плавления и нового затвердевания. При этом выделяется газообразный аммиак и образуется биурет:

$$2NH_2 - CO - NH_2 = H_2N - CO - NH - CO - NH_2 + NH_3.$$

Для обнаружения последнего сплав растворяют, по охлаждении, в 10%-ном растворе NaOH и прибавляют 1—2 капли 1%-ного раствора $CuSO_4$. Появляется фиолетовое окрашивание, характерное для биуретовой пробы.

Работа 143. Количественное определение мочевины в моче по Бородину

Этот метод основан на том, что при действии бромноватистокислого натрия (гипобромита) на мочевину выделяется азот:

$$CO(NH_2)_2 + 3NaBrO = N_2 + CO_2 + 3NaBr + 2H_2O$$

и по объему выделившегося азота вычисляется содержание мочевины в исследуемой моче. Однако, при действии бромноватистой щелочи на мочу азот выделяется не только из мочевины, но и из аммиака:

$$2NH_3 + 3NaBrO = N_2 + 3NaBr + 3H_2O,$$

а отчасти из креатинина, мочевой кислоты и некоторых других азотистых веществ мочи. Кроме того, частично образуется и выделяется непоглощаемая щелочью окись углерода. Ошибка, происходящая от этого в случае определения мочевины в моче, вообще не велика уже потому, что мочевина в моче составляет главную часть азотистых веществ. Кроме того, эта ошибка практически компенсируется противоположной ошибкой, которая обусловлена тем, что при действии бромноватистой щелочи на мочевину не образуется всего теоретически ожидаемого количества азота, а именно: 1 г мочевины образует лишь около 355 мл азота (при 0° и 760 мм) вместо 373 мл. Во всяком случае, этот метод, пригодный для определения мочевины в моче, непригоден для определений в тканях[1].

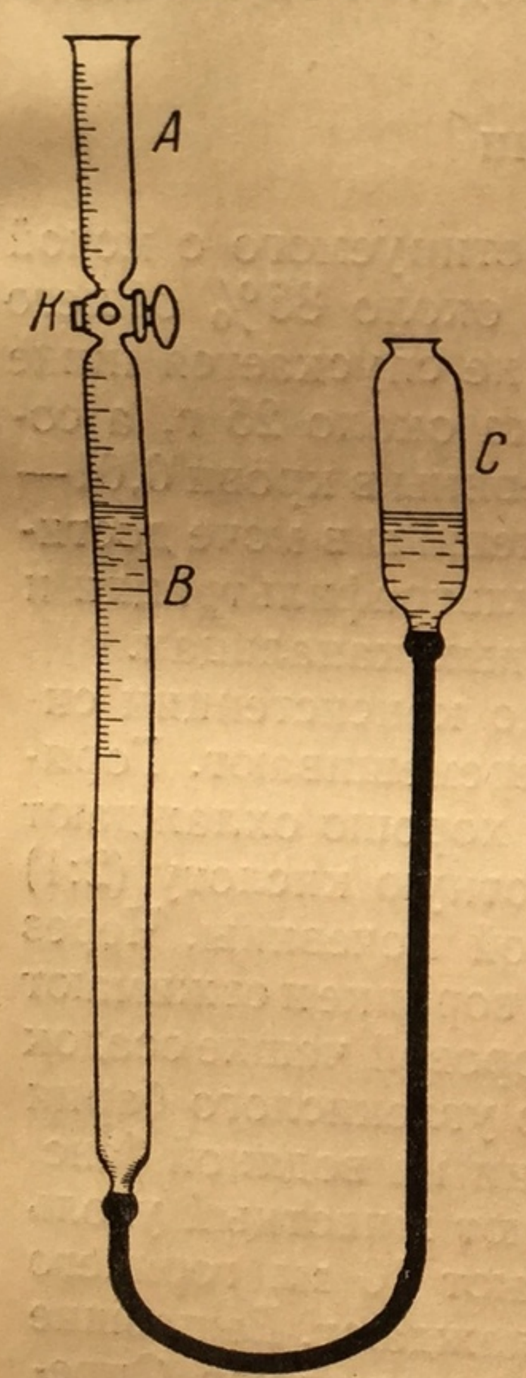


Рис. 19. Прибор Бородина для определения азота мочевины.

Для определения пользуются прибором Бородина (рис. 19). Наливают в грушу *C* прибора насыщенный раствор хлористого натрия и, поднимая грушу, заполняют жидкостью всю нижнюю часть прибора *B* и просвет трехходового крана *K*.

Мочу предварительно разбавляют водой точно в пять раз. Наливают разбавленную мочу в верхнюю часть прибора *A* и, опустив грушу *C*, поворотом крана *K* переводят 10 мл ее из *A* в *B*. Избыток мочи из *A* выпускают наружу через боковой отросток крана *K*, споласкивают *A* водой и заполняют раствором бромноватистокислого натра. Затем поворотом крана *K* переводят небольшими порциями (при опущенной груше *C*) раствор бромноватистой щелочи из *A* в *B* до тех пор, пока прекратится заметное выделение газа в *B*.

[1] Новый метод определения мочевины в тканях и жидкостях организма предложен В. Ореховичем и А. Тустановским («Биохимия», т. XIV, стр. 443, 1949).

Ждут еще 10—20 минут и устанавливают после этого грушу *C* так, чтобы жидкость в ней и в бюретке *A* стояла на одном уровне. Таким образом, приводят собранный азот к атмосферному давлению. Измеряют объем газа и отмечают температуру и барометрическое давление.

При вычислении результатов анализа прежде всего приводят найденный объем азота (V) к объему сухого газа (V_0), находящегося при нормальных условиях, т. е. 0° и 760 мм рт. ст. Для этого служит формула:

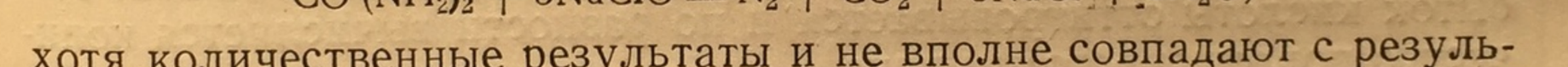
$$V_0 = \frac{V(p-b)\,273}{760\,(273+t)},$$

где: p — барометрическое давление в мм ртутного столба, b — упругость водяного пара при температуре опыта, а t — температура.

Так как 1 мл сухого азота при нормальных условиях весит 0,0012508 г, то, зная объем V_0, легко найти вес выделившегося азота: $V_0 \cdot 0{,}0012508$ г. Это количество азота выделилось за счет мочевины в 2 мл неразведенной мочи, а, следовательно, в 100 мл исследуемой мочи азот мочевины составляет: $V_0 \cdot 0{,}0012508 \cdot 100/2$ г.

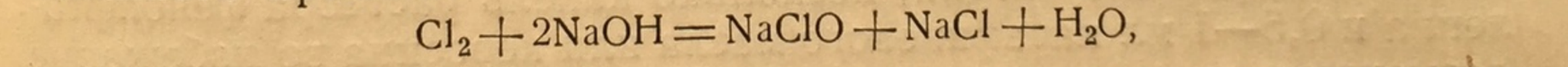
Вычисляют суточное выведение азота мочевины. У человека в норме за сутки выводится, в среднем, 10,5 г азота мочевины.

Раствор бромноватистокислого натрия готовится приливанием, при хорошем охлаждении и под тягой, 50 мл брома к раствору 300 г едкого натра в 1000 мл воды. При отсутствии брома бромноватистая щелочь может быть заменена раствором гипохлорита натрия, который с мочевиной реагирует так же:



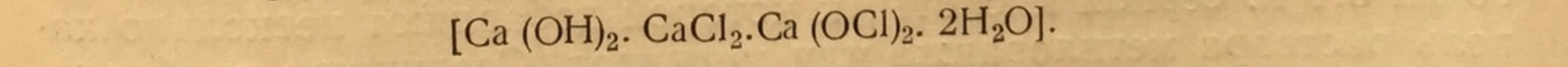
$$CO(NH_2)_2 + 3NaClO = N_2 + CO_2 + 3NaCl + 2H_2O,$$

хотя количественные результаты и не вполне совпадают с результатами, получаемыми с гипобромитом. Проще всего гипохлорит получить, насыщая хлором 30%-ный раствор NaOH до соответственного привеса:



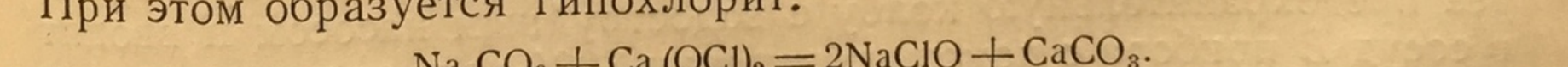
$$Cl_2 + 2NaOH = NaClO + NaCl + H_2O,$$

но можно приготовить его, пользуясь насыщенным раствором соды, к которому добавляется двойной объем свежеприготовленного и отфильтрованного раствора белильной извести:



$$[Ca(OH)_2 . CaCl_2 . Ca(OCl)_2 . 2H_2O].$$

При этом образуется гипохлорит:



$$Na_2CO_3 + Ca(OCl)_2 = 2NaClO + CaCO_3.$$

Осадок углекислого кальция отфильтровывается и раствор гипохлорита сохраняется в темной склянке.

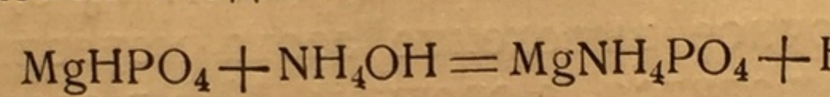
Работа 144. **Количественное определение азота аммиака в моче**

У высших животных (млекопитающие, амфибии, рыбы), у которых главная часть азота выводится в виде мочевины, наряду с по-

следней постоянно выводится и некоторое, в норме незначительное, количество аммонийных солей. Обычно на долю аммонийных солей у человека приходится 2,5—5,5% общего азота мочи. Выведение аммиака в виде аммонийных солей стоит в прямой связи с процессами нейтрализации образующихся в организме нелетучих кислот. Таким образом, ацидоз связан с увеличением выведения аммиачного азота с мочой и по количеству выделяемых аммонийных солей можно судить о размерах и интенсивности процесса образования нелетучих кислот в организме. Так, например, при сахарном диабете, когда, благодаря нарушению окислительных процессов, образуется много нелетучих кислот, выведение азота аммиака может достигать 30—40% общего азота мочи.

У растительноядных животных с мочой выводится меньше аммиачного азота, чем у плотоядных животных. У низших животных аммонийные соли иногда составляют главную форму, в виде которой выводится азот из организма.

Моча всегда содержит кислые фосфаты калия, натрия, кальция и магния и поэтому, если моча имеет щелочную реакцию, то может образоваться осадок:



$$MgHPO_4 + NH_4OH = MgNH_4PO_4 + H_2O.$$

Поэтому, при взятии пробы такой мочи для определения аммиачного азота, следует или хорошо взболтать осадок, или подкислить мочу для его растворения.

Метод определения аммиака в моче основан на вытеснении аммиака из его солей щелочью. Аммиак током воздуха отгоняется и количественно поглощается титрованной серной кислотой. Избыток кислоты оттитровывается и по разности вычисляется количество поглощенного аммиака.

25 мл исследуемой мочи помещают с помощью пипетки в сосуд *В* прибора, подобного изображенному на рис. 18. Добавляют туда же 15 г хлористого натрия, несколько капель раствора фенолфталеина и 0,5—1 мл парафинового масла или керосина во избежание возможного вспенивания жидкости. Наполняют промывную склянку *А* 50%-ной серной кислотой для освобождения просасываемого воздуха от пыли и летучих оснований. Затем в сосуд *Д* помещают 30 мл 0,1 н. серной кислоты, к которой добавляют несколько капель раствора метилоранжа или метилрот. Соединяют прибор через предохранительную колбу с водоструйным насосом и вводят в сосуд *В* прибора с помощью воронки 30%-ного раствора едкого натра или насыщенного раствора соды до яркокрасного окрашивания жидкости. Нагревают сосуд *В* прибора на водяной бане при 25—30° и протягивание воздуха через прибор продолжают 2 часа.

Отъединяют сосуд *Д* и титруют избыток несвязанной аммиаком 0,1 н. серной кислоты 0,1 н. раствором едкого натра до перехода окраски индикатора из розовой в желтую. Вычитая из всего объема взятой 0,1 н. кислоты (30 мл) объем несвязанной аммиаком кислоты, находят объем 0,1 н. кислоты, связанной аммиаком, и ре-

зультат определения выражают в мг или г азота аммиака в 100 мл мочи и вычисляют суточное количество выводимого азота аммиака.

Если, например, в результате определения оказались связанными аммиаком 10 мл 0,1 н. серной кислоты, то азот аммиака в 25 мл взятой мочи составляет $0{,}0014 \cdot 10 = 0{,}014$ г, а в 100 мл мочи $0{,}014 \cdot 4 = 0{,}056$ г или 56 мг. Если суточный объем мочи 1 500 мл, то за сутки с мочой выводится 0,84 г азота аммиака.

В норме суточное выделение азота аммиака у человека 0,5—1,0 г, что составляет 2,5—5,5% общего азота мочи.

Работа 145. **Колориметрическое определение азота аммиака в моче по Сергееву**

Берут 0,1—0,2 мл мочи и вносят в мерную колбу на 50 мл. Добавляют 0,3 мл 30%-ного раствора едкого натра и 0,5 мл реактива Несслера и доводят затем дестиллированной водой до метки. В другую колбу на 50 мл вносят 1 мл стандартного раствора сернокислого аммония (0,05 мг азота), 0,3 мл 30%-ного едкого натра и 0,5 мл реактива Несслера и также доводят водой до метки. Окраска полученных растворов сравнивается в колориметре Дюбоска.

Очевидно, что при равной интенсивности окраски, наблюдаемой в колориметре, концентрация исследуемого раствора x и концентрация стандартного раствора C обратнопропорциональны высотам измеряемых в колориметре слоев H_x и H и, следовательно, неизвестная концентрация:

$$x = \frac{H \cdot 0{,}05 \cdot 100}{H_x \cdot 0{,}1} = \text{мг\%}$$ азота аммиака в исследуемой моче.

Если в исследуемой моче много креатинина, то при добавлении реактива Несслера получается помутнение, препятствующее колориметрированию. В этих случаях моча предварительно разбавляется в два раза водой.

Работа 146. **Открытие креатинина в моче**

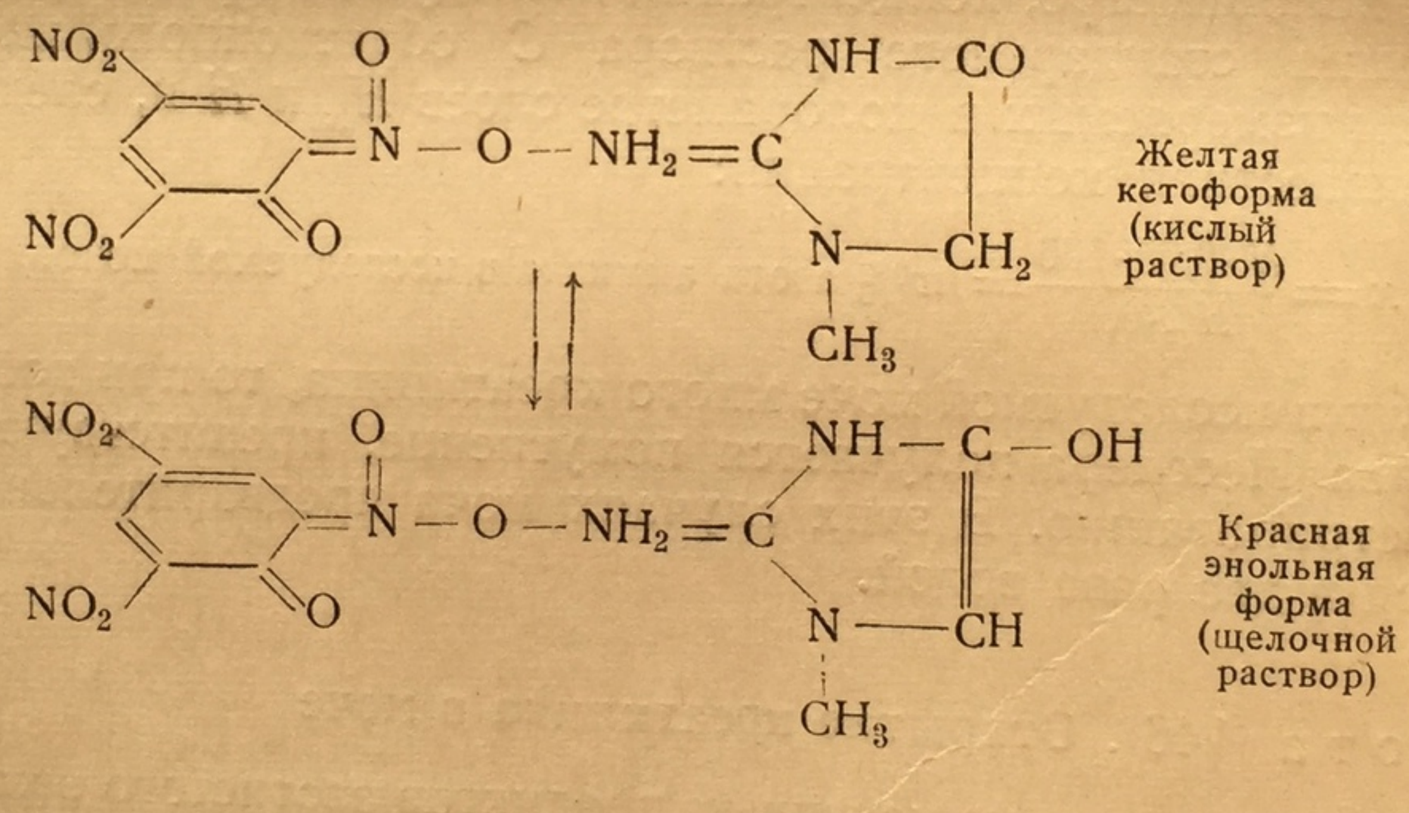
Креатинин один из конечных продуктов азотистого обмена как у человека, так и у многих животных и поэтому является постоянной составной частью мочи. В норме его выделение довольно постоянно. При мясной пище, богатой креатином, количество выводимого с мочой креатинина повышается и в моче, кроме того, появляется креатин (креатинурия). В некоторых случаях креатинурия наблюдается и при безмясной пище и свидетельствует об усиленном распаде тканевых белков. У человека в детском возрасте креатинурия нормальное явление. В щелочных растворах, особенно при нагревании, креатинин частично переходит в креатин, а под действием кислот креатин может быть превращен в креатинин. Частичное превращение креатинина в креатин поэтому может проис-

ходить при стоянии щелочной мочи, вследствие чего при определении не следует употреблять давно стоявшую мочу.

Для открытия креатинина в моче могут служить следующие пробы.

1. Реакция с нитропруссидом натрия. К 2—3 мл мочи прибавляют несколько капель свежеприготовленного 3%-ного раствора нитропруссида натрия [$Na_2Fe(CN)_5 \cdot NO$] и затем подщелачивают жидкость несколькими каплями 10%-ного раствора едкого натра. Жидкость окрашивается вследствие образования изонитрозокреатинина в красный цвет, быстро переходящий в темный. В отличие от пробы на ацетон (работа 83), здесь подкисление уксусной кислотой не вызывает образования вишнево-красного окрашивания. Если же подкисленную уксусной кислотой жидкость кипятить, то она приобретает зеленовато-синеватую окраску, вследствие образования железистосинеродистой соли окиси железа.

2. Реакция образования пикрата креатинина. К 2—3 мл мочи прибавляют несколько капель насыщенного раствора пикриновой кислоты и затем подщелачивают жидкость, добавляя несколько капель раствора едкого натра. Появляется оранжево-красная окраска вследствие образования окрашенного пикрата таутомерной формы креатинина:



Креатин, в противоположность креатинину, дает желтое окрашивание, которое только через несколько часов превращается в оранжево-красное (за счет перехода части креатина в креатинин). Сходные окраски дают и аргинин, гистидин и гликоколл, однако, красная окраска здесь появляется только спустя 10—12 часов и при достаточно высокой концентрации этих аминокислот, например, в гидролизатах желатины и других белков.

Обе описанные реакции на креатинин практически с успехом могут быть применяемы, причем вторая из них лежит в основе следующего колориметрического способа количественного определения креатинина.

Работа 147. **Количественное определение креатинина в моче**

Метод основан на сравнении интенсивности окраски при реакции на креатинин с пикриновой кислотой в исследуемой моче и в стандартном растворе креатинина с содержанием 1 мг креатинина в 1 мл. Можно, однако, воспользоваться сравнением интенсивности окраски исследуемой мочи при реакции с пикриновой кислотой, производимой в определенных условиях, с окраской 0,5 н. раствора бихромата калия (24,54 г $K_2Cr_2O_7$, высушенного при 130°, в 1000 мл воды). Интенсивность окраски такого раствора в слое толщиной 8 мм равна интенсивности окраски слоя толщиной 8,1 мм такого раствора, который получается при реакции на образование окраски с пикриновой кислотой, в описываемых ниже условиях, с 1 мл исходного раствора, содержащим 1,0 мг креатинина.

Этот метод, как и все колориметрические методы, основан на том положении, что интенсивность окраски раствора окрашенного вещества, по крайней мере в пределах определенных концентраций, прямо пропорциональна концентрации раствора. При равной интенсивности окраски, наблюдаемой в колориметре, для двух растворов концентрации их C_1 и C_2 обратнопропорциональны соответствующим высотам измеряемых в колориметре слоев H_1 и H_2 этих растворов и, следовательно, неизвестная концентрация может быть найдена так:

$$C_1 = \frac{H_2}{H_1} C_2.$$

При определении креатинина в моче этим способом следует иметь в виду, что присутствие ацетона и ацетоуксусной кислоты влияет на окраску, образующуюся при реакции с пикриновой кислотой.

В один из стаканчиков колориметра Дюбоска наливают стандартный раствор бихромата и устанавливают стаканчик таким образом, чтобы свет проходил через слой раствора бихромата высотой 8 мм. Затем в мерную колбу емкостью 50 мл вносят 1 мл исследуемой мочи, 1,5 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты и 0,5 мл 10%-ного раствора NaOH. Ровно через 5 минут доливают дестиллированную воду до метки, перебалтывают содержимое колбы и тотчас наливают окрашенную жидкость во второй стаканчик колориметра. Теперь, вращая винт, добиваются такого положения этого стаканчика, при котором наблюдается одинаковая окраска обеих половин освещенного поля зрения колориметра и замечают соответствующую высоту столба исследуемой жидкости. Повторяют эту операцию несколько раз и берут среднюю высоту столба жидкости H_1. Концентрация исследуемой мочи, очевидно, будет:

$$C_1 = \frac{8,1}{H_1} \text{ мг в 1 мл.}$$

Таким образом, если, например, при колориметрировании высота слоя исследуемого раствора оказалась равной 10 мм, то в 1

мл мочи содержится креатинина 8,1:10=0,81 мг. Если объем суточной мочи 1500 мл, то суточное выделение креатинина 0,81·1500=1215 мг, или 1,2 г.

Количество выделяемого за сутки с мочой креатинина довольно постоянно. У человека оно в норме колеблется в среднем от 1—2 г. При различных заболеваниях, особенно лихорадочных состояниях, количество выводимого креатинина может значительно увеличиваться.

Работа 148. Количественное определение креатина в моче

Для определения креатина в моче он предварительно переводится в креатинин, после чего вышеописанным методом определяется сумма креатинина и креатина мочи. Содержание креатина находится затем по разности между суммой креатинин-креатин и параллельно определяемым содержанием креатинина.

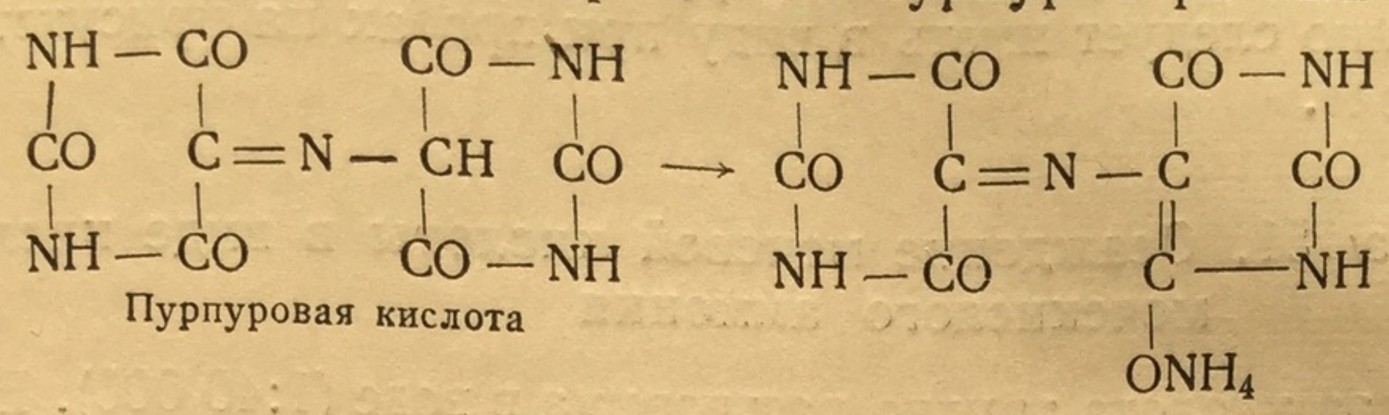
Для превращения креатина в креатинин 10 мл исследуемой мочи и 5 мл 1,0 н. соляной кислоты нагревают с обратным воздушным холодильником (на шлифу) на кипящей водяной бане. Моча сильно темнеет, но это не препятствует определению, так как при дальнейшем разбавлении окраска почти исчезает. После трехчасового нагревания жидкость переносят в мерную колбу на 20 мл, ополаскивая туда же и сосуд для кипячения. Доводят водой до метки. Теперь берут 2 мл жидкости, которые отвечают 1 мл исходной мочи, вносят в колбу емкостью 50 мл, добавляют 1,5 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты и 0,5 мл 10% NaOH и дальнейшее определение ведут, как это описано выше для креатинина. Отдельно для той же мочи определяют креатинин. Вычитают из результата первого определения результат второго определения. Полученная разность дает количество креатинина, образовавшегося из креатина. Для пересчета этой разности в г или мг креатина помножают ее на 1,16 (отношение молекулярного веса креатина к молекулярному весу креатинина).

Работа 149. Качественное открытие мочевой кислоты в моче

100 мл не содержащей белка мочи упаривают на водяной бане до половины объема, по охлаждении добавляют 10 мл концентрированной соляной кислоты и оставляют стоять сутки. Выпавшие на дне и стенках сосуда темнобурые, окрашенные пигментами мочи кристаллы мочевой кислоты отфильтровывают и употребляют для следующих качественных проб.

С небольшим количеством полученных и высушенных кристаллов мочевой кислоты проделывают м у р е к с и д н у ю п р о б у, которая основана на том, что при окислении мочевой кислоты азотной кислотой среди продуктов окисления образуется аллоксантин, перегруппировывающийся в пурпуровую кислоту, аммонийная

соль которой (мурексид) окрашена в пурпурнокрасный цвет:



Пурпуровая кислота

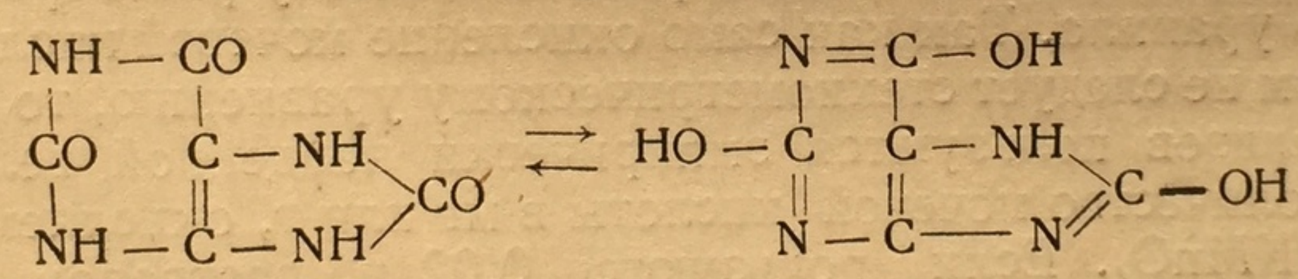
Мурексид

Калийная соль пурпуровой кислоты также ярко окрашена в сине-фиолетовый цвет.

К нескольким кристаллам мочевой кислоты в маленькой фарфоровой чашке добавляют 1—2 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно выпаривают на пламени под тягой досуха. По охлаждении добавляют 1—2 капли концентрированного раствора аммиака, причем появляется интенсивное пурпурно-красное окрашивание за счет образования мурексида. Такую же пробу проделывают, добавляя не аммиак, а раствор едкого калия; появляется красивое сине-фиолетовое окрашивание.

Работа 150. **Исследование некоторых свойств мочевой кислоты**

Оставшиеся от предыдущей пробы кристаллы мочевой кислоты нагревают с водой, причем растворения не происходит. При добавлении к жидкости раствора едкой щелочи мочевая кислота переходит в раствор в виде соли, что связано с реакцией таутомерной формы мочевой кислоты:



К части полученного щелочного раствора мочевой кислоты прибавляют несколько капель разбавленного раствора $CuSO_4$. Выпадает грязнозеленый осадок мочекислой соли окиси меди. Этот осадок уже при стоянии, а еще быстрее при нагревании, переходит благодаря окислению части мочевой кислоты в белый осадок мочекислой закиси меди.

Восстановительные свойства мочевой кислоты могут быть продемонстрированы еще следующим опытом. К разбавленному щелочному раствору мочевой кислоты добавляют по каплям раствора $CuSO_4$ до начинающегося выпадения голубого осадка гидрата окиси меди. Смесь кипятят одну-две минуты, причем выпадает, благодаря восстановлению окисной меди, красный осадок закиси меди.

Этот опыт показывает, что при открытии редуцирующих сахаров нагреванием в щелочных растворах с окисной медью, при достаточ-

но длительном нагревании обнаруживается и мочевая кислота, что особенно следует иметь в виду при пробах на присутствие сахара в моче.

Работа 151. Осаждение мочевой кислоты в виде кислого мочекислого аммония

Мочевая кислота трудно растворима в воде (1:40 000). Ее однозамещенные соли щелочных металлов (первичные ураты) трудно растворимы в воде, легче растворимы вторичные ураты (двузамещенные соли). Растворимость мочевой кислоты и первичных уратов повышается в присутствии коллоидов. Этим обусловлена растворимость мочевой кислоты в биологических жидкостях. Кислая аммонийная соль мочевой кислоты мало растворима в воде и поэтому часто образует белый осадок в моче. Эта соль может также служить для осаждения мочевой кислоты при ее количественном определении.

К 2 мл щелочного раствора мочевой кислоты, оставшимся от предыдущей задачи, добавляют 4 мл насыщенного раствора хлористого аммония. Выпадает осадок кислого мочекислого аммония.

Работа 152. Определение мочевой кислоты в моче

Определение основано на осаждении мочевой кислоты в виде мочекислого аммония и дальнейшем титрометрическом окислении мочевой кислоты перманганатом. Во избежание осаждения вместе с мочевой кислотой других окисляющихся перманганатом веществ предварительно осаждают их, обрабатывая мочу раствором уксуснокислого уранила. Так как само окисление мочевой кислоты перманганатом не следует стехиометрическому уравнению, то при расчетах анализов пользуются эмпирически найденной величиной, дающей количество мочевой кислоты в мг или г, окисляемое 1 мл раствора $KMnO_4$. Если пользуются 0,02 н. раствором $KMnO_4$, то имеют в виду, что 1 мл такого раствора эквивалентен 1,5 мг мочевой кислоты, а при употреблении 0,05 н. раствора $KMnO_4$ расчет ведут, считая, что 1 мл раствора $KMnO_4$ эквивалентен 3,75 мг мочевой кислоты.

К 16 мл исследуемой мочи добавляют 4 мл уранилового реактива и через 15 минут выпавший осадок фосфорнокислого уранила и муционоподобных веществ мочи отфильтровывают. Из прозрачного фильтрата отбирают две пробы по 7,5 мл, что отвечает 6 мл исходной мочи, переносят в две центрифужных пробирки и, добавив по 10—15 капель 25%-ного аммиака, оставляют стоять, закрыв пробкой. Мочевая кислота осаждается в виде мочекислого аммония. Пробирки, уравновесив, центрифугируют, прозрачную жидкость сливают. К осадку добавляют по 5 мл раствора сернокислого аммония (600 г сернокислого аммония в 600 мл воды и после добавки 10 мл 25%-ного аммиака доводят до 1000 мл), взмучивают осадок,

снова центрифугируют и сливают прозрачный центрифугат. К осадку в каждую пробирку добавляют 4 мл дестиллированной воды и осторожно 1 мл концентрированной серной кислоты, причем жидкость разогревается. Горячую жидкость при температуре не ниже 50° титруют из микробюретки до появления не исчезающего за 10 секунд розового окрашивания 0,05 н. раствором перманганата. Берут среднее из результатов двух параллельных определений.

Если, например, на титрование было израсходовано 0,8 мл 0,05 н. раствора $KMnO_4$, каждый миллилитр которого отвечает 3,75 мг мочевой кислоты, то количество мочевой кислоты, выводимой за сутки, при объеме суточной мочи 1200 мл будет:

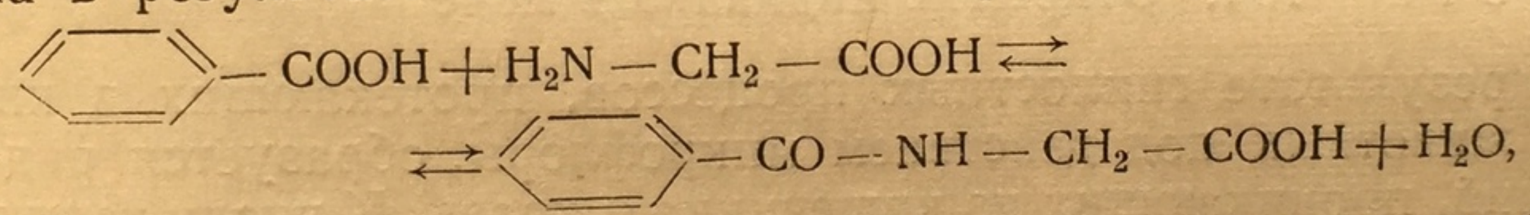
$$\frac{0{,}8 \cdot 3{,}75 \cdot 1200}{6} = 600 \text{ мг, или } 0{,}6 \text{ г.}$$

Если хотят выразить полученный результат определения в виде азота мочевой кислоты, то полученную цифру делят на три, так как молекулярный вес мочевой кислоты 168, а вес содержащегося в ней азота 56 (168:56=3).

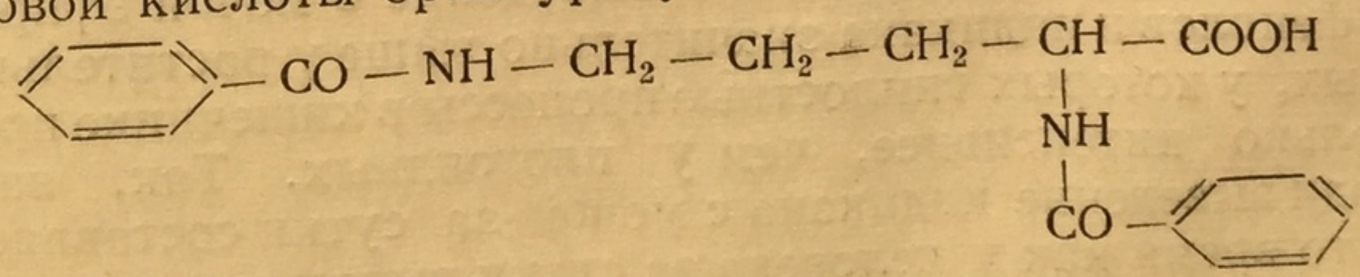
За сутки выводится с мочей у человека в среднем 0,17—0,6 г азота мочевой кислоты.

Работа 153. **Определение гиппуровой кислоты в моче**

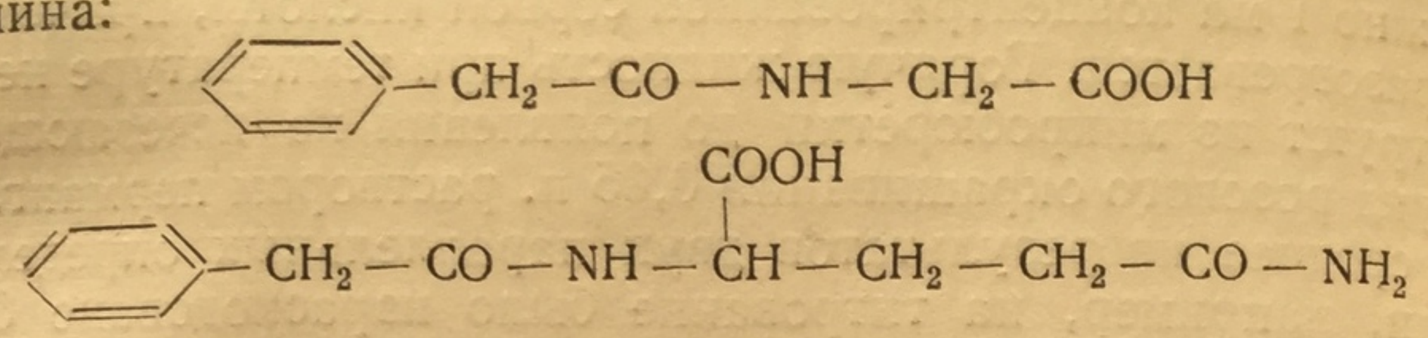
Гиппуровая кислота образуется в организме почти всех позвоночных животных (кроме птиц) из бензойной кислоты и гликоколла в результате энзиматического процесса:



происходящего в клетках почек, печени и отчасти мышц. Образование ее связано с обезвреживанием бензойной кислоты, проникающей из кишечника или образующейся при окислении в организме. Количество выводимой с мочой из организма гиппуровой кислоты находится в зависимости от состава пищи. Особенно много гиппуровой кислоты образуется при растительной пище, поэтому ее много в моче растительноядных животных. Например, в моче лошади и коровы содержание ее достигает 2,5%, в то время как в моче человека гиппуровой кислоты всего около 0,05% или немногим более. Некоторое незначительное количество гиппуровой кислоты образуется в организме независимо от состава пищи. Выведение с мочой гиппуровой кислоты возрастает при введении животному с пищей бензойной кислоты или ее натровой соли. Птицы при введении бензойной кислоты выделяют вместо гиппуровой кислоты орнитуровую кислоту:



Аналогично бензойной кислоте фенилуксусная кислота выделяется в виде фенацетуровой или, у человека, в виде фенацетилглутамина:

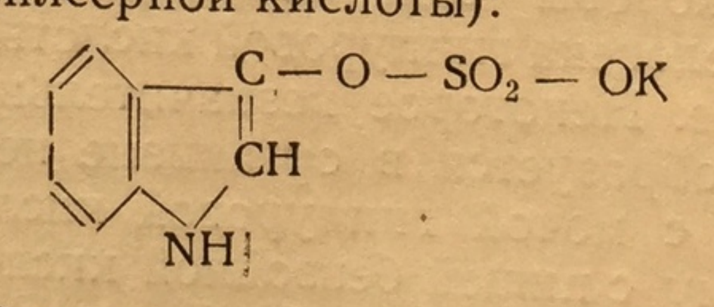


Растворяют при нагревании 45 г хлористого натрия в 150 мл исследуемой мочи. По охлаждении добавляют 1,2 мл 10 н. серной кислоты и оставляют на сутки для полного выпадения кристаллов гиппуровой кислоты. Выпавший осадок отфильтровывают и промывают до полного удаления серной кислоты (проба с раствором $BaCl_2$) 30%-ным раствором хлористого натрия. Затем из осадка гиппуровую кислоту извлекают горячей водой, раствор количественно переносят в колбу для титрования, добавляют 3 капли фенолфталеина и горячий раствор титруют до розового окрашивания с 5 н. раствором NaOH.

Находят содержание гиппуровой кислоты в мг % и определяют суточное выделение ее. Суточное количество гиппуровой кислоты, выделяемое с мочой человека, сильно колеблется в зависимости от характера пищи от 0,1 до 2,0 г.

Работа 154. **Открытие индикана в моче**

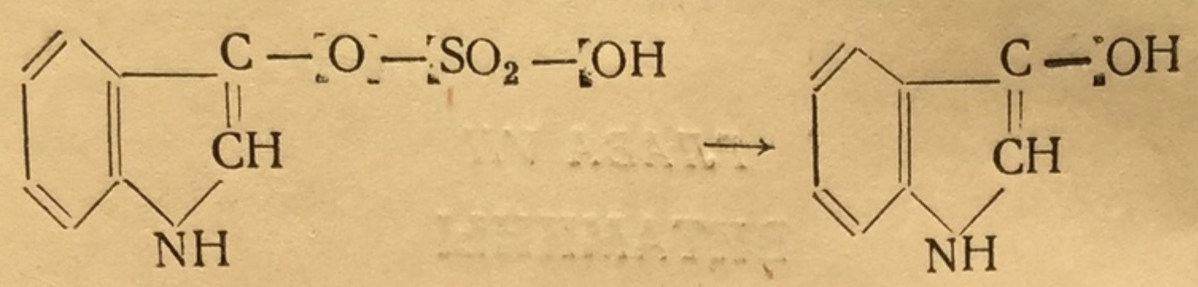
В результате гнилостных процессов, протекающих в кишечнике животных под действием микрофлоры, образуется ряд соединений, проникающих из кишечника в кровь. К числу таких соединений относятся: фенол, *p*-крезол, пирокатехин, гидрохинон и индол со скатолом. Все эти соединения обезвреживаются, главным образом, в печени, где фенолы превращаются в кислые эфиры серной кислоты или глюкозиды глюкуроновой кислоты. Индол и скатол окисляются в индоксил и скатоксил, которые затем образуют эфиры с серной кислотой. Таким образом, образование и выведение с мочой как эфиросерных кислот фенолов, так и индикана (калиевой соли индоксилсерной кислоты):



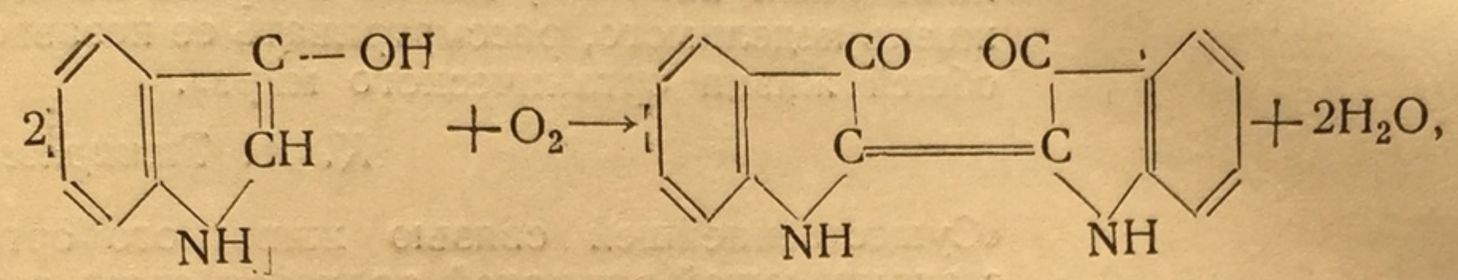
находятся в прямой связи с интенсивностью гнилостных процессов в кишечнике. По этой причине выведение с мочой эфиросерных кислот фенолов и индикана значительно выше у растительноядных животных, у которых гнилостные процессы в кишечнике протекают значительно интенсивнее, чем у плотоядных. Так, например, у лошади выведение индикана с мочой за сутки составляет около 2,0 г, в то время как у человека за сутки выводится в норме всего

лишь 0,01—0,3 г индикана. Повышенное выведение индикана свидетельствует об увеличении гнилостных процессов, выходящих за пределы нормы.

В основе качественного открытия индикана лежит омыление сернокислого эфира с образованием индоксила:



и дальнейшее окисление индоксила в индиготин (синее индиго):



окраска которого делается особенно хорошо заметной при экстрагировании его в слой хлороформа.

Берут 10 мл не содержащей белка мочи, подкисляют уксусной кислотой, добавляют 1—2 мл 10%-ного раствора уксуснокислого свинца [$Pb(CH_3.COO)_2$] для осаждения пигментов мочи, перемешивают и фильтруют. К 2—3 мл фильтрата добавляют равный объем реактива, представляющего собою 0,2%-ный раствор $FeCl_3$ в концентрированной соляной кислоте и хорошо встряхивают. Добавляют 1—2 мл хлороформа и снова хорошо встряхивают. При наличии индикана в исследуемой моче слой хлороформа окрашивается в синий цвет за счет экстрагируемого индиго.

ГЛАВА VII

ВИТАМИНЫ

«Изучая жизненные явления, мы постоянно должны иметь в виду непрерывность, преемственность жизненных явлений, мы не в праве выхватывать жизнь неделимого, рассматривать ее независимо от общей жизни органического мира».

К. А. Тимирязев.

«Существеннейшей связью животного организма с окружающей природой является связь через известные химические вещества, которые должны постоянно поступать в состав данного организма, т. е. связь через пищу».

И. П. Павлов.

Под названием витамины объединяется обширная группа весьма разнообразных по своему строению органических соединений, которым свойственна общая роль в питании животного организма. Полноценное питание возможно лишь в том случае, когда пища наряду с белками, липоидами, углеводами и минеральными веществами, доставляющими организму энергетический и пластический материал, содержит витамины.

Действие витаминов открыто русским ученым Николаем Ивановичем Луниным в 1880 г. Важные работы в области химии и биохимии витаминов осуществлены в Советском Союзе Б. А. Лавровым, А. В. Палладиным, Б. Кудряшевым, В. Н. Букиным и другими исследователями.

Витамины — вещества высокой биологической активности, не являющиеся источником энергии или пластического материала, но играющие существенную роль в процессах обмена в животном организме. Участие витаминов в осуществлении важнейших биохимических процессов в организме животного и отсутствие у последнего, за отдельными исключениями, способности к полному синтезу витаминов, делает витамины или соединения, из которых они могут образоваться в организме животного путем частичного синтеза, строго необходимыми частями пищи животного.

Во многих случаях витамины являются несинтезируемыми или трудно синтезируемыми в животном организме веществами, которые в таком организме необходимы как источник биосинтеза физиологически активных соединений. Так, например, пирофосфорный эфир тиамина (витамин B_1) является частью каталитиче-

ской системы обмена пировиноградной кислоты, а рибофлавин (витамин B_2) служит исходным веществом для биосинтеза различных коферментов (ксантин- и глициноксидаз, желтых ферментов и ряда других).

В норме содержание витаминов в пище очень незначительно, но их полное исключение или недостаточное содержание в пище приводит к нарушению процессов обмена, расстройствам роста и различных физиологических функций организма. Все эти явления при дальнейшем своем развитии приводят к тяжелым заболеваниям. Заболевания, возникающие на почве полного или почти полного исключения того или иного витамина из пищи, носят общее название авитаминозов. При недостаточном поступлении витамина с пищей, в количествах, не покрывающих физиологических потребностей животного, развивается особая форма витаминной недостаточности — гиповитаминоз. Потребность в отдельных витаминах у различных видов животных качественно и количественно различна.

В большинстве случаев витамины синтезируются клетками растительных организмов. В отдельных случаях в растениях синтезируются провитамины, которые уже в организме животного превращаются в витамины. Некоторые низшие растения, также как и животные, не способны к самостоятельному синтезу отдельных витаминов и для нормальной жизнедеятельности требуют присутствия таких витаминов в питательных средах. Подобного рода грибы, водоросли и бактерии реагируют на отсутствие в питательной среде соответствующего витамина резким прекращением роста, что может быть во многих случаях использовано в качестве метода определения витаминов.

Для определения содержания витаминов в различных биологических материалах служат разнообразные химические, главным образом, колориметрические или титриметрические, методы.

Витаминное действие определяется в биологическом опыте на тех или иных животных и выражается в «единицах», представляющих собой ту наименьшую дозу витамина, которая бывает достаточной, чтобы при лечебном испытании устранить признаки начавшегося авитаминоза или в профилактическом опыте предохранить животное от развития авитаминоза.

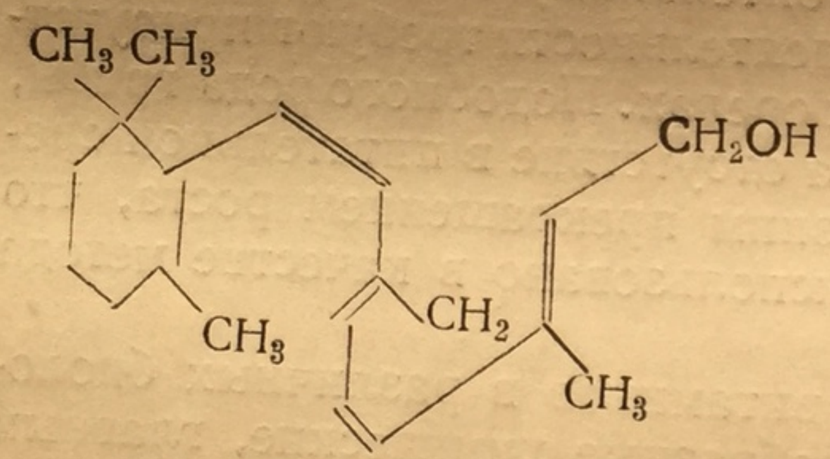
ГРУППА ВИТАМИНА А

При отсутствии в пище молодых животных витамина А явления авитаминоза выражаются прежде всего в остановке или задержке роста и потере веса. Витамин А участвует в образовании зрительного пурпура и поэтому недостаток у человека витамина А приводит к расстройству зрения (гемералопии). Кроме того, наблюдаются расстройства ряда других физиологических функций и понижение сопротивляемости организма инфекциям. При далеко зашедшем авитаминозе А развиваются ороговения эпителиальных клеток

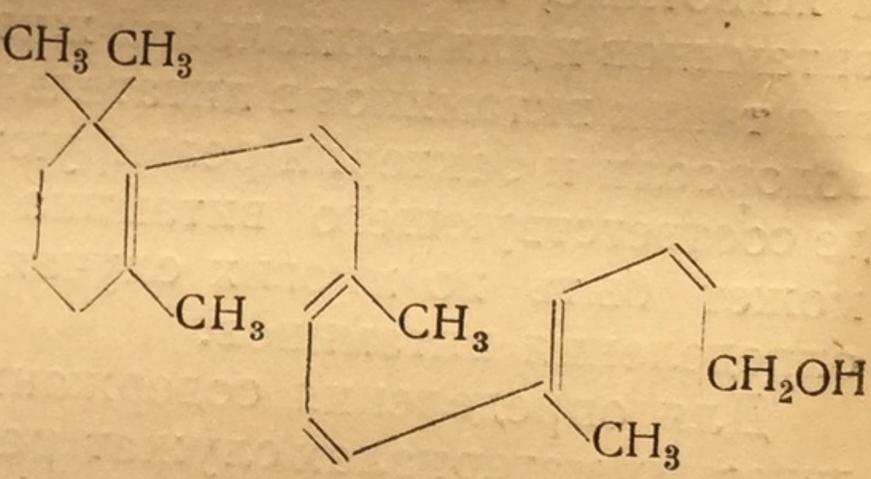
(гиперкератозы), изменения роговицы глаза (кератомаляция) и, наконец, ксерофтальмия.

Витамин А — жирорастворимый витамин, растворим в жирорастворителях, устойчив к действию щелочей и легко окисляется кислородом воздуха. Витамин А находится только в животных организмах и, следовательно, только в животных жирах и не найден в растительных. Почти у всех млекопитающих, за исключением некоторых плотоядных, витамин А образуется из каротиноидов в печени под действием каротиназы. Каротиноиды, являющиеся, таким образом, провитаминами А, синтезируются только в растениях. Таким образом, содержание витамина А и каротиноидов в животном организме находится в зависимости от содержания в пище растительных каротиноидов.

Наибольшее количество витамина А (до 85—90% общего количества) накапливается в печени животных и поэтому жир печени, особенно рыб, содержит большое количество витамина А. Витамин А (аксерофтол, витамин A_1), выделенный из жира печени морских рыб и находящийся в организме млекопитающих, имеет строение β-апо-6-каротинола. В жирах пресноводных рыб, наряду с витамином А, содержится близкий к нему по свойствам и строению, открытый советскими исследователями, витамин A_2 (β-апо-5-каротинол).



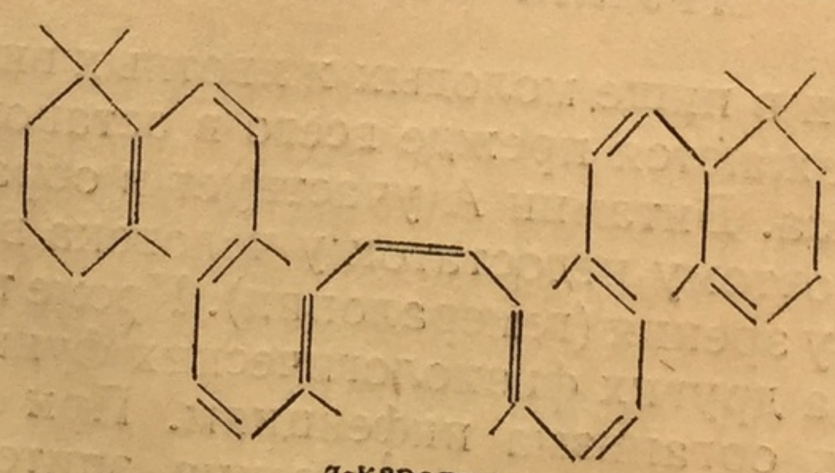
Витамин A_1 (аксерофтол)



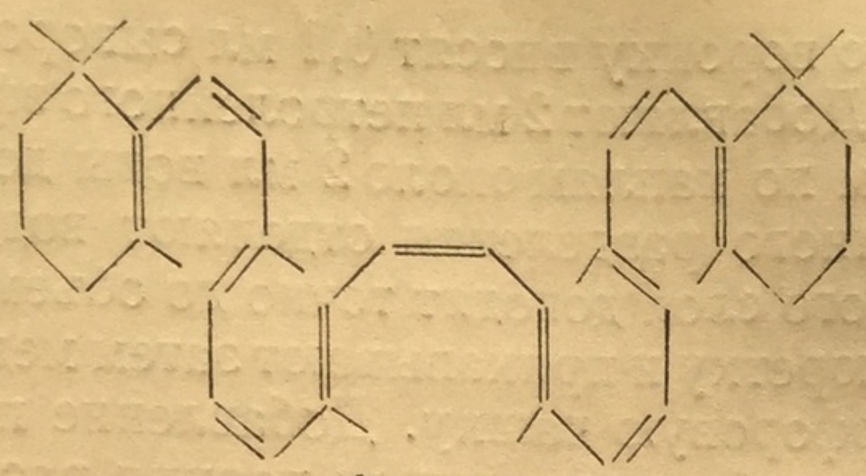
Витамин A_2

Возможно существование и других природных веществ с активностью витамина А. Суточная потребность в витамине А у человека около 2 мг.

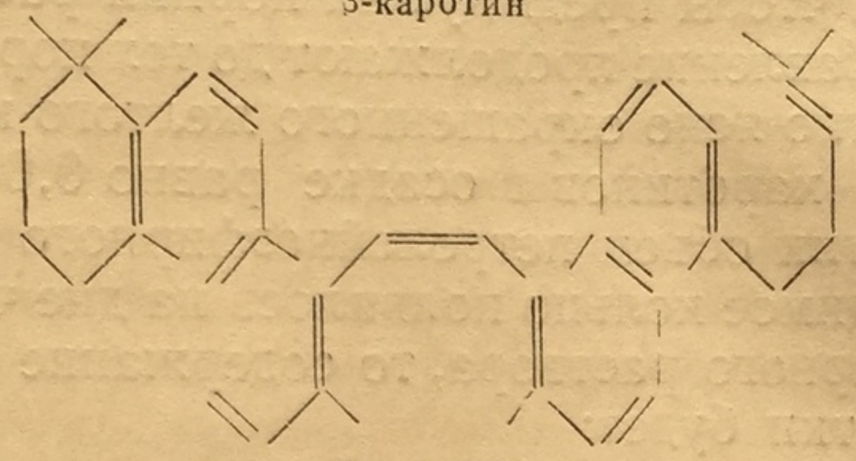
Провитамины А — каротиноиды находятся почти во всех растительных организмах. Провитамином А может быть только каротиноид, содержащий в молекуле хотя бы один β-иононовый цикл. Наиболее важными провитаминами А являются α-, β- и γ-каротины:



α-каротин



β-каротин



γ-каротин

В растениях они часто находятся совместно; так, например, из моркови получают смесь, состоящую из 85% β-каротина, 15% α-каротина и 0,1% γ-каротина. Из всех провитаминов А наибольшей активностью в биологическом опыте обладает β-каротин; минимальная суточная доза, необходимая для роста крыс, для β-каротина составляет 2,5γ, для других провитаминов А — 5γ, для афаницина —10 γ. Эта минимальная доза β-каротина отвечает одной „крысиной единице" (RE) биологической активности. Суточная потребность человека 5000 интернациональных единиц; (одна единица эквивалентна 0,6 γ β-каротина). Обычно около 50—70% каротиноидов пищи теряется с калом.

Работа 155. **Цветные реакции на витамин А**

1. Реакция с треххлористой сурьмой. Несколько капель рыбьего жира растворяют в 2 мл сухого хлороформа в сухой пробирке и добавляют 2 мл насыщенного при 20° (33%) раствора треххлористой сурьмы. При наличии витамина А быстро образуется синее окрашивание, постепенно бледнеющее. Каротин также дает цветную реакцию с треххлористой сурьмой с зелено-голубым окрашиванием раствора (см. работу 157).

2. К 1 мл раствора исследуемого жира в хлороформе добавляют 0,5—1,0 мл концентрированной соляной кислоты или уксусного ангидрида и 4 мл 1,3-дихлоргидрина глицерина. Смесь нагревают несколько минут при 25°. Развивается стойкое голубоватое окрашивание. Такую же реакцию дает и каротин. Витамины D_2 и D_3 дают зеленое окрашивание.

Работа 156. **Определение суммы каротиноидов в сыворотке крови по Рачевскому**

Каротиноиды крови экстрагируются петролейным эфиром. Интенсивность окраски сухого остатка экстракта пропорциональна количеству каротиноидов.

В делительную воронку вносят 0,1 мл сыворотки и 2 мл спирта и перемешивают. Добавляют 2 мл петролейного эфира, встряхивают и добавляют затем по каплям около 2 мл воды до разделения двух слоев. После полного разделения отделяют водный слой и объем петролейноэфирного слоя доводят точно до объема 2 мл. Отбирают раствор в микробюретку и прикапывают затем медленно в нагретую до 40° сухую фарфоровую чашку. Добавление по каплям ведут с такой скоростью, чтобы предыдущая порция раствора испарилась досуха. Такое добавление продолжают до тех пор, пока на дне чашки не будет заметно ясно окрашенного желтого кольца. В этот момент содержание каротинов в осадке равно 0,05γ. Отмечают спущенный из бюретки объем петролейноэфирного раствора.

Если ясно видимое кольцо появилось на дне чашки после испарения 0,5 мл эфирного раствора, то содержание суммы каротинов в 100 мл сыворотки будет:

$$\frac{0{,}05 \cdot 2 \cdot 100}{0{,}5 \cdot 0{,}1} = 200\gamma,$$

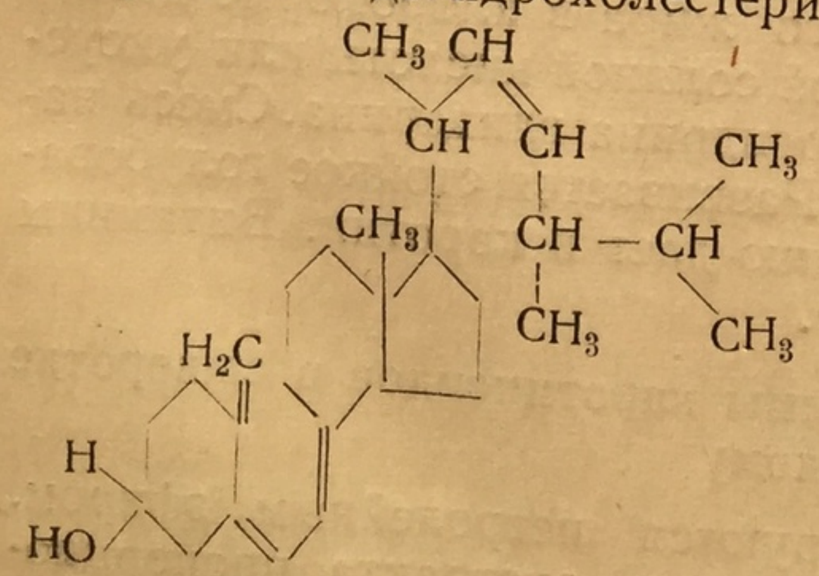
т. е. 0,2 мг%.

ГРУППА ВИТАМИНА D

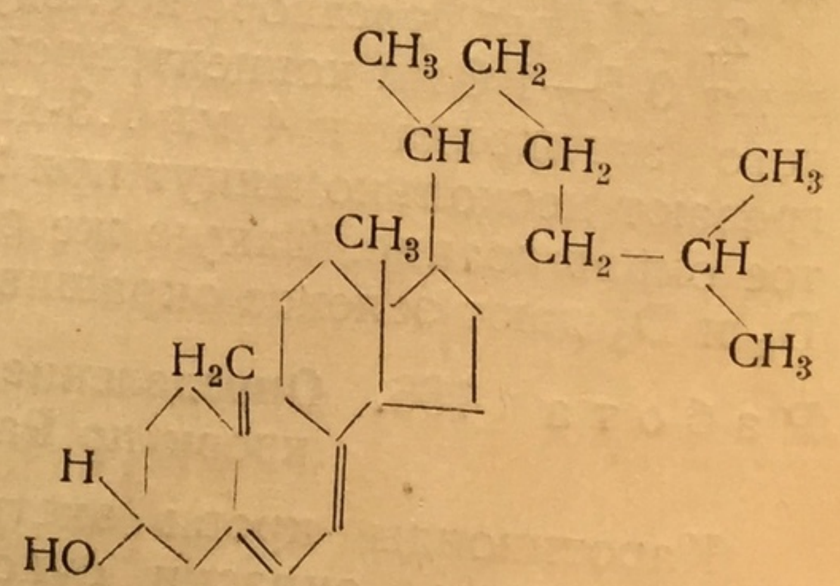
Витамины D принадлежат к группе антирахитических витаминов. При отсутствии в пище витаминов D нарушается фосфорно-кальциевый обмен и обизвествление костей, вследствие чего в детском возрасте развивается рахит, а у взрослых — явления остеомаляции. Витамины D лишь частично могут образоваться в организме животного при облучении его ультрафиолетовыми лучами.

Витамины D относятся к жирорастворимым витаминам и находятся обычно в неомыляемой фракции жиров. Они образуются при облучении ультрафиолетовым светом некоторых стеринов, которые поэтому называются «провитаминами» D. В растениях не обнаружено витаминов D; в них находятся провитамины D—стерины. Особенно богаты витамином D жиры печени различных морских рыб.

В настоящее время из жира печени рыб выделены в чистом виде два природных витамина D: витамин D_2 или кальциферол, и витамин D_3, которые получены и синтетически при облучении эргостерина и 7-дегидрохолестерина:

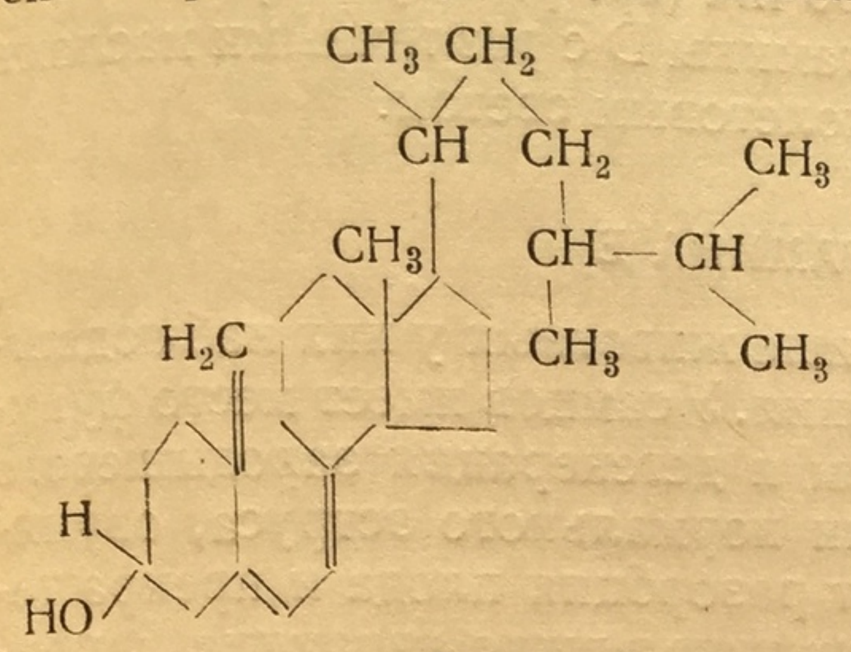


Витамин D_2 (кальциферол) (из эргостерина)

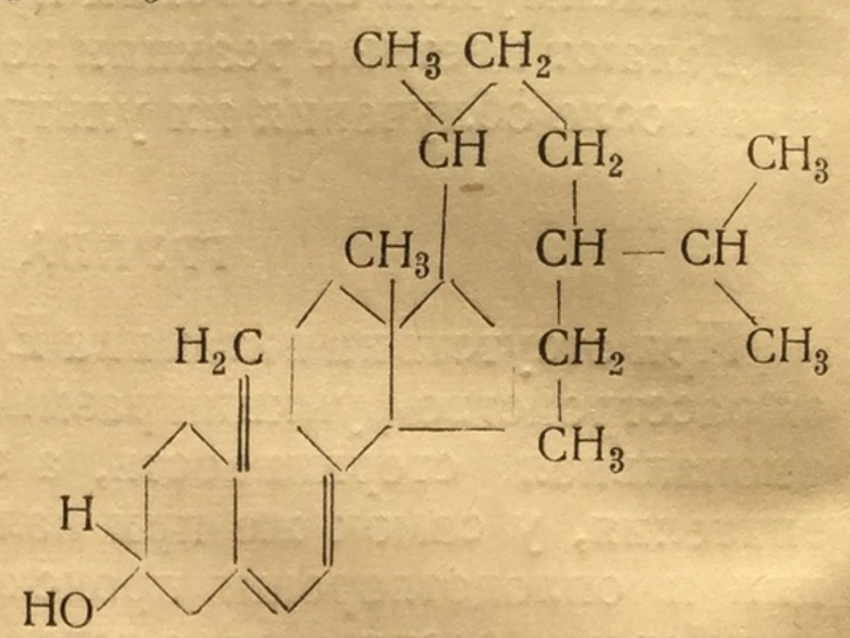


Витамин D_3 (из 7-дегидрохолестерина)

Кроме того, при облучении 22-дигидроэргостерина и 7-дегидроситостерина получены витамины D_4 и D_5.



Витамин D_4



Витамин D_5

Все эти различные витамины D, как полученные из природных продуктов, так и синтетически, имеют различную активность. Кроме того, один и тот же из витаминов D обладает различной активностью в опытах на различных животных.

За интернациональную единицу витамина D принимается 0,025 γ кальциферола (витамина D_2) в 1 мг оливкового масла. Суточная потребность в витамине D у человека 400—800 инт. ед., у беременных в период лактации потребность выше — до 1000 инт. ед. в сутки.

Провитамины D могут быть обнаружены обычными реакциями на стерины. Химические методы определения витамина D несколько ненадежны, так как реакции, предложенные для этого, не являются специфичными. Для суждения о недостаточности витамина D часто прибегают к косвенным способам. Так, например, падение содержания неорганического фосфора в сыворотке крови с 4—5 мг% в норме до 1—2 мг% P может указывать на недостаточность витамина D.

Работа 157. **Цветные реакции на витамин D**

1. К 1 мл раствора витамина D в хлороформе добавляют 0,5 мл концентрированной соляной кислоты и 4 мл 1,3-дихлоргидрина глицерина. Через некоторое время появляется зеленое окрашивание, которое можно колориметрировать. Витамин A в этих условиях дает голубое окрашивание.

2. В большой пробирке к 3 мл рыбьего жира, облученного масла или масляного раствора витамина D добавляют смесь из 15 частей анилина и 1 части концентрированной соляной кислоты. Тщательно перемешивают и нагревают до кипения, после чего кипятят еще 30 секунд. Желтая эмульсия делается вначале зеленой, а затем принимает красную окраску. Через две-три минуты происходит расслоение эмульсии; при этом нижний слой окрашен в интенсивный красный цвет.

3. К жиру, содержащему витамин D, или к раствору витамина D в хлороформе, добавляют насыщенный раствор треххлористой

сурьмы в хлороформе. Образуется желтое окрашивание с характерным максимумом адсорбции при 500 mμ (ср. работу 155).

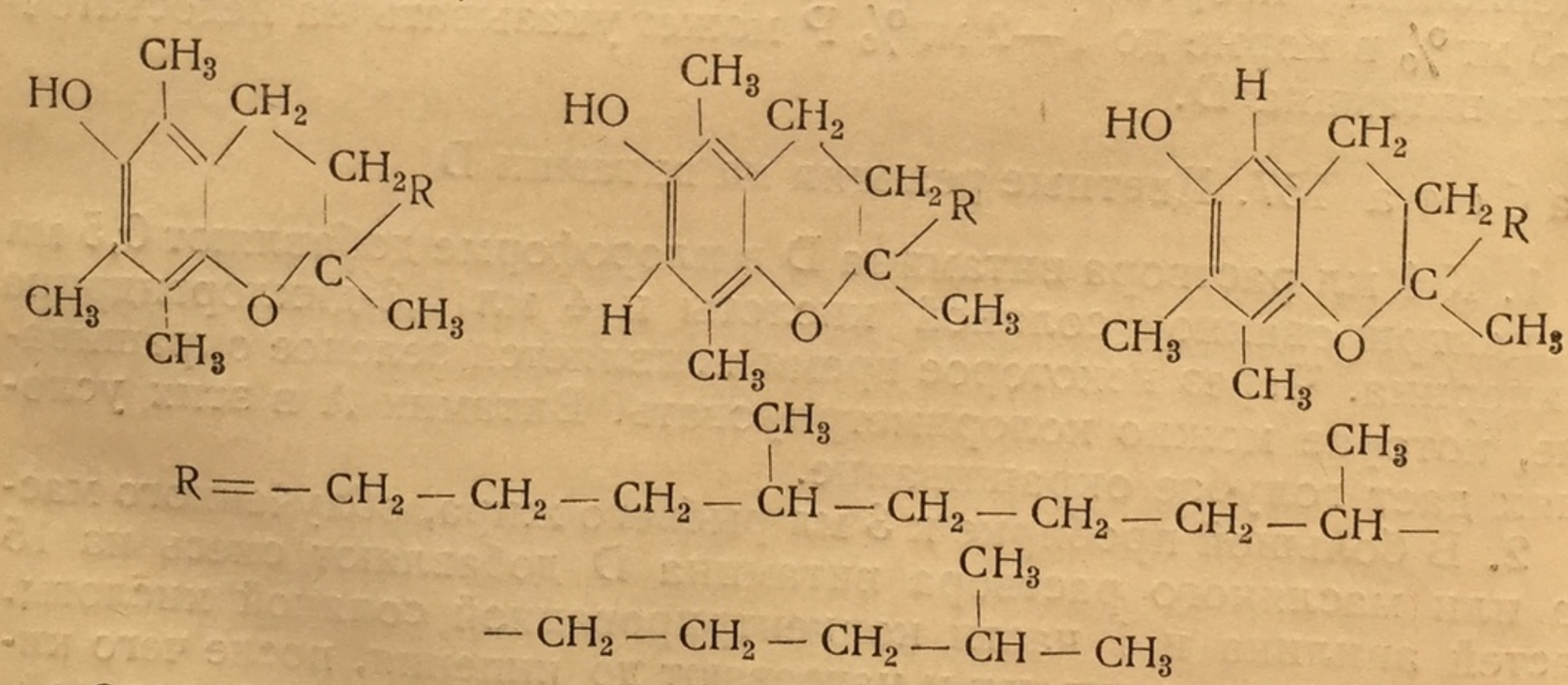
Делают цветные реакции на витамины D с различными маслами до и после облучения их ультрафиолетовым светом.

ГРУППА ВИТАМИНА Е

При отсутствии витамина Е в пище животных у них наблюдается расстройство функций размножения. У самцов имеет место функциональная стерильность, а затем и дегенерация зародышевого эпителия, у самок же при наличии нормального эструса, овуляции и оплодотворения происходит разорбция плода и прекращение беременности. Кроме того, отсутствие в пище витамина Е приводит к нарушению физиологических функций и дегенерации скелетных мышц. Необходимость витамина Е установлена экспериментально для мышей, крыс, кроликов, морских свинок, собак и цыплят. Потребность человека в витамине Е не определена.

Витамин Е — жирорастворимый витамин, широко распространенный в составе высших растений, особенно богаты им масла из зародышей пшеницы, ржи, кукурузы, хлопка, шиповника и других растений. В различных органах и тканях животных он находится в значительно меньшем количестве. В жире из печени рыб он совершенно отсутствует. В составе жиров и масел витамин Е довольно стоек, но при очистке очень легко окисляется и чувствителен к кислороду и щелочам.

Из различных естественных источников витамина Е выделены три физиологически активных соединения: α-токоферол (5,7,8-триметилтокол), β-токоферол (5,8-диметилтокол) и γ-токоферол (7,8-диметилтокол):



Эти соединения входят в различных количествах в состав витамина Е, получаемого из разных источников. В масле из зародышей пшеницы находятся α-и β-токоферолы в различных пропорциях, а иногда в небольших количествах и γ-токоферол. Наоборот, в масле хлопчатника находится преимущественно γ-токоферол. Эти соединения различны по своей биологической активности,

измеряемой в биологическом опыте на крысах и выраженной в «крысинах единицах» (RE). Так, активность 1 г α-токоферола — 400 крысиных единиц, 1 г β-токоферола —200 крысиных единиц и 1 г γ-токоферола —200 крысиных единиц.

Для химического определения витамина Е служат некоторые реакции токоферолов, приводящие к образованию окрашенных продуктов. В отдельных случаях для суждения о недостаточности витамина Е пользуются и косвенными методами. Так, например, у кролика суточное выведение креатина с мочой составляет 10 мг. При недостаточности витамина Е количество выводимого креатина увеличивается в два и более раз.

Работа 158. **Открытие витамина Е**

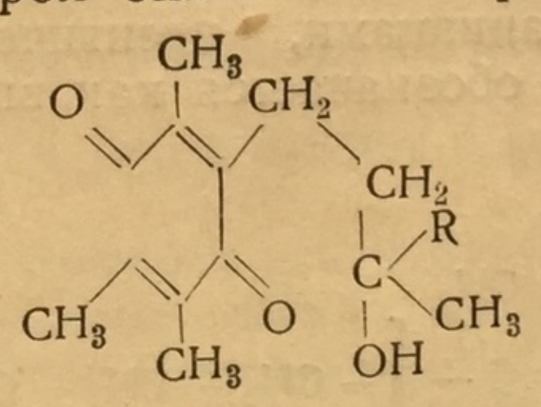
Токоферолы окисляются в алкогольном растворе хлорным железом, которое восстанавливается в хлористое. Последнее образует с α,α'-дипиридилом комплексную соль красного цвета.

5 г исследуемого масла нагревают 5 минут на водяной бане с обратным холодильником с 10 мл 2 н. спиртового едкого калия. После омыления смесь растворяют в 15 мл метилового спирта и 40 мл воды и трижды экстрагируют эфиром или петролейным эфиром. Эфирный экстракт промывают водой, высушивают над хлористым кальцием, выпаривают досуха и остаток растворяют в спирте. К спиртовому раствору добавляют двойной объем раствора 0,25 г хлорного железа и 0,5 г α, α'-дипиридила в 1000 мл ледяной уксусной кислоты. В присутствии витамина Е появляется красное окрашивание.

Для определения витамина Е в плазме крови 10 мл плазмы смешивают с 5 мл 0,2 н. едкого калия, 15 мл формалина и 15 мл этилового спирта, нагревают и затем извлекают эфиром. С эфирным экстрактом поступают по предыдущему. Этот способ может быть использован и для количественных определений.

Работа 159. **Количественное определение витамина Е по Захаровой и Девятнину**

При действии концентрированной азотной кислоты в алкогольном растворе α-токоферол окисляется через хинон в соединение,



окрашенное в красный цвет. Сравнением в колориметре интенсивности окраски с окраской специально подобранного стандартного раствора можно определить количество α-токоферола.

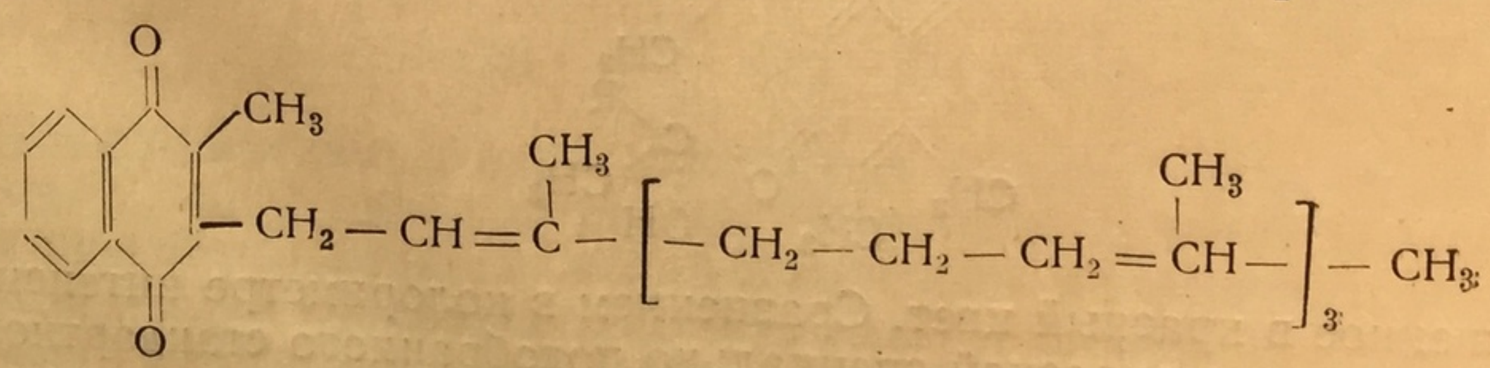
В колбу с обратным холодильником помещают навеску исследуемого масла около 5 г и 20 мл 10%-ного спиртового раствора едкого калия и нагревают при кипении на водяной бане 20 минут. Растворяют мыло в четырехкратном объеме воды, переносят раствор в делительную воронку и экстрагируют четыре раза серным эфиром (по 50 мл каждый раз). Эфирный экстракт промывают водой для удаления щелочи, сушат безводным хлористым кальцием, фильтруют и отгоняют эфир в токе углекислоты. К остатку после отгонки эфира добавляют 5 мл спирта, нагревают на водяной бане до полного растворения. Прибавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты (уд. веса 1,4) и нагревают при кипении с обратным холодильником ровно 3 минуты. После охлаждения окрашенный раствор фильтруют и сравнивают в колориметре интенсивность окраски с окраской стандартного раствора, отвечающей содержанию 0,12 мг α-токоферола в 1 мл. Такой раствор готовят, смешивая 50 мл раствора 20 мг бромтимолблау в 96%-ном спирте с 2 мл раствора 1 мг основного фуксина в 5 мл 96%-ного спирта.

ГРУППА ВИТАМИНА К

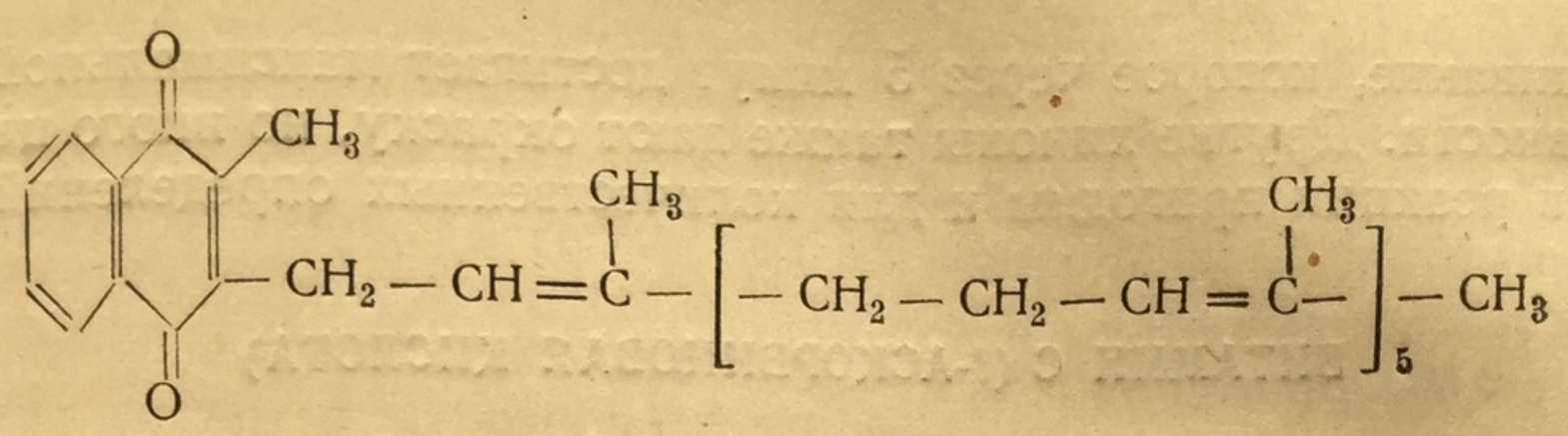
У животных при недостаточности витамина К (коагуляционного витамина) наблюдается резкое замедление свертываемости крови. Это влечет за собою внутренние кровоизлияния в тканях и органах животного. Такие геморрагические явления связаны с падением содержания в крови протромбина. Введение витамина К повышает содержание протромбина, увеличивает скорость свертывания крови и устраняет явления авитаминоза К. Повидимому, витамин К способствует синтезу протромбина в печени.

Витамин К широко распространен у высших растений, где он находится преимущественно в зеленых частях, и у многих микроорганизмов, особенно бактерий. Он практически отсутствует у дрожжей и других грибов. В органах и тканях животных он находится в значительно меньших количествах, чем в растениях. Сравнительно большое количество витамина К содержится в печени свиньи.

Витамин К из высших растений идентичен 2-метил-3-фитил-1,4-нафтохинону и обозначается как витамин K_1, а витамин К, образуемый микроорганизмами, идентичен 2-метил-3-дифарнезил-1,4-нафтохинону и обозначается как витамин K_2:



Витамин K_1 = 2-метил-3-фитил-1,4-нафтохинон

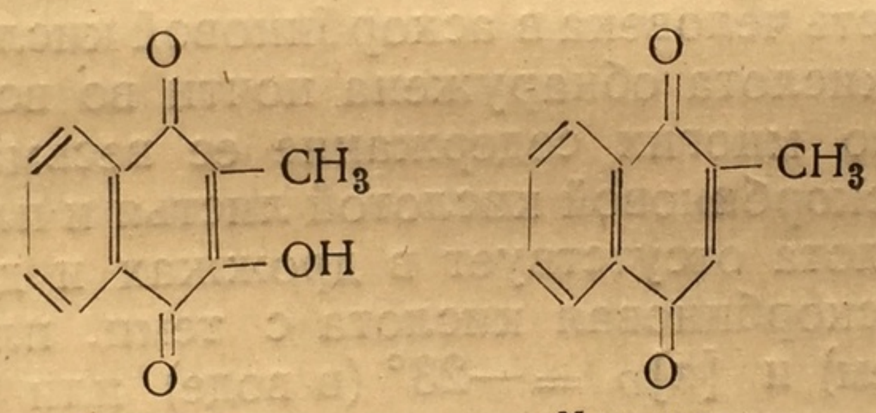


Витамин K_2=2-метил-3-дифарнезил-1,4-нафтохинон

У животных встречается как витамин K_2, так и K_1. Биологическая активность витамина K_1 в полтора раза выше, чем витамина K_2. Витамины K_1 и K_2 неустойчивы при действии воздуха и щелочей. Нерастворимы в воде, растворимы в жирорастворителях. При нагревании с водой расщепляются с образованием фталевой кислоты.

Кроме витаминов K_1 и K_2 многие другие производные 1,4-нафтохинона обладают в той или иной мере выраженной активностью витамина К. Сюда принадлежат природный фтиокол (2-метил-3-окси-1,4-нафтохинон) и синтетический метинон (2-метил-1,4-нафтохинон).

В то время, как первый в 500 раз менее активен, чем витамин K_1, второй в два-три раза активнее витамина K_1 и поэтому находит применение в качестве синтетического заменителя природного витамина К.



Фтиокол

Метинон

Для качественного и количественного химического определения витаминов К применяются некоторые цветные реакции. В качестве методов, дающих возможность судить о недостаточности витамина К, могут служить определения протромбина или времени свертывания крови.

Работа 160. **Цветные реакции на витамин К**

Следующие реакции проделывают с спиртовым раствором метинона.

1. К 5 мл раствора метинона добавляют 1 мл 1%-ного спиртового раствора диэтилмалонового эфира и 0,2 мл 1%-ного водного раствора едкого калия. Появляется фиолетово-красное окрашивание.

2. К 2 мл спиртового раствора добавляют 2 мл 5%-ного раствора диэтилдитиокарбамата в 95%-ном спирте и 1 мл алкогольной щелочи, полученной растворением 2 г металлического натрия в 100 мл 95%-ного алкоголя. Витамин К дает кобальтово-голубое

окрашивание, которое через 5 минут достигает максимальной интенсивности. Другие хиноны также дают окраску, но иного цвета.

Эти реакции пригодны и для количественных определений.

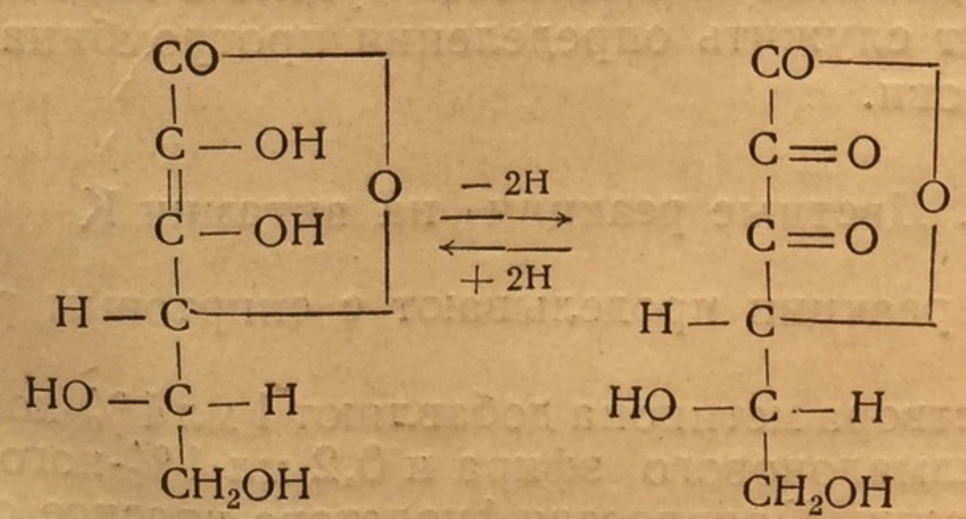
ВИТАМИН С (*l*-АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА)

При отсутствии в пище человека, обезьян и морских свинок *l*-аскорбиновой кислоты (витамина С) у них наступают явления авитаминоза — цынги. Другие животные в норме или мало или совсем не нуждаются в витамине С, что возможно зависит от способности их организма к синтезу аскорбиновой кислоты. Часть цынготных явлений, в частности геморрагические, обусловлены, повидимому, одновременным отсутствием витамина Р и, таким образом, цынга является комплексным авитаминозом.

Содержание витамина С в тканях и органах человека и млекопитающих животных невелико. Содержание *l*-аскорбиновой кислоты у человека: в крови 0,2—2,0 мг %, в спинномозговой жидкости 3—5 мг %, в молоке 4—8 мг %. У млекопитающих наибольшее содержание аскорбиновой кислоты наблюдается в надпочечниках (160 мг %), печени (25 мг %) и почках (12 мг %). У человека в норме при содержании аскорбиновой кислоты в крови не ниже 0,5 мг %, часть введенной аскорбиновой кислоты выводится с мочой. Суточная потребность человека в аскорбиновой кислоте 75—100 мг.

Аскорбиновая кислота обнаружена почти во всех высших растениях, причем во многих содержание ее весьма значительно. Наиболее богаты аскорбиновой кислотой листья и плоды растений. Аскорбиновая кислота отсутствует в дрожжах и других грибах.

Природная *l*-аскорбиновая кислота с темп. плавления 190—192° (с разложением) и $[\alpha]_D = -23°$ (в воде) или $[\alpha]_D = +48°$ (в метиловом спирте) очень легко окисляется в растворах. Окисление протекает тем быстрее, чем выше pH раствора. В кислых растворах аскорбиновая кислота обратимо окисляется, превращаясь в нестойкую и физиологически неактивную дегидроаскорбиновую кислоту:

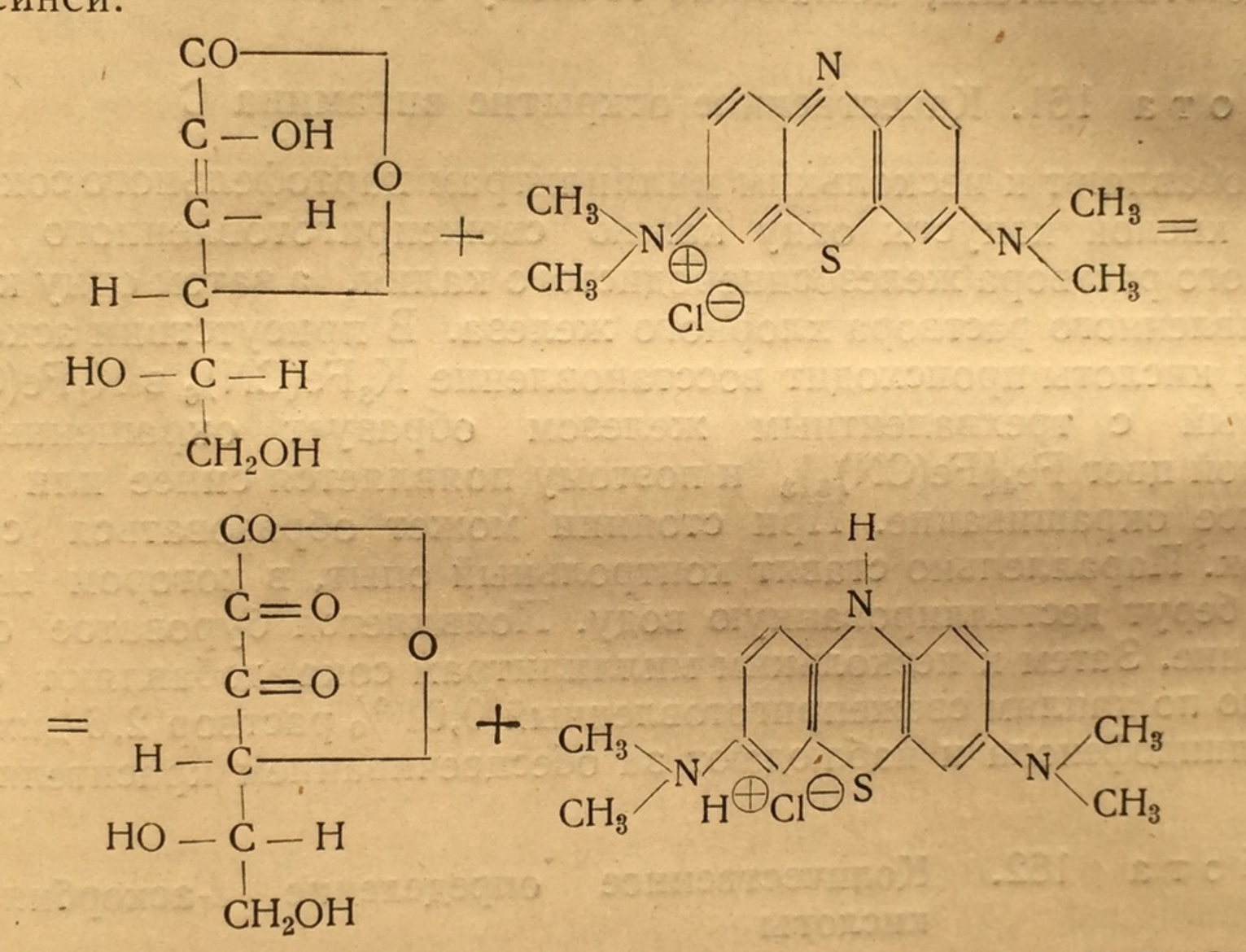


Дальнейшее окисление, протекающее особенно быстро в щелочных растворах, необратимо и приводит к образованию щавелевой и *l*-треоновой кислот. Обратное восстановление дегидроаскорбиновой кислоты происходит, например, при действии серово-

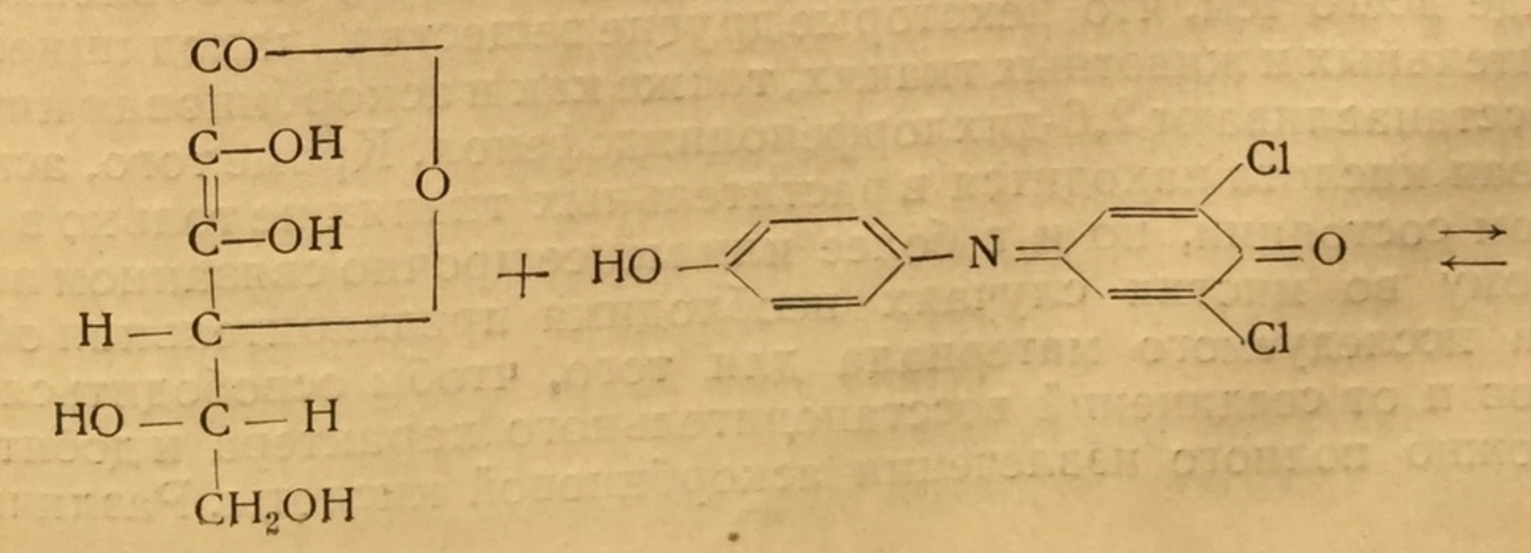
дорода, причем наиболее полно при pH = 4,5. Во многих растениях, наряду с аскорбиновой кислотой, находится специфический фермент — аскорбиноксидаза (Cu-протеид), ускоряющий реакцию обратимого окисления ее в дегидроаскорбиновую кислоту в присутствии молекулярного кислорода. Аскорбиновая кислота является частью окислительно-восстановительной системы растительной клетки. Она активирует катепсин, эстеразу и ряд других биохимических систем в животном организме.

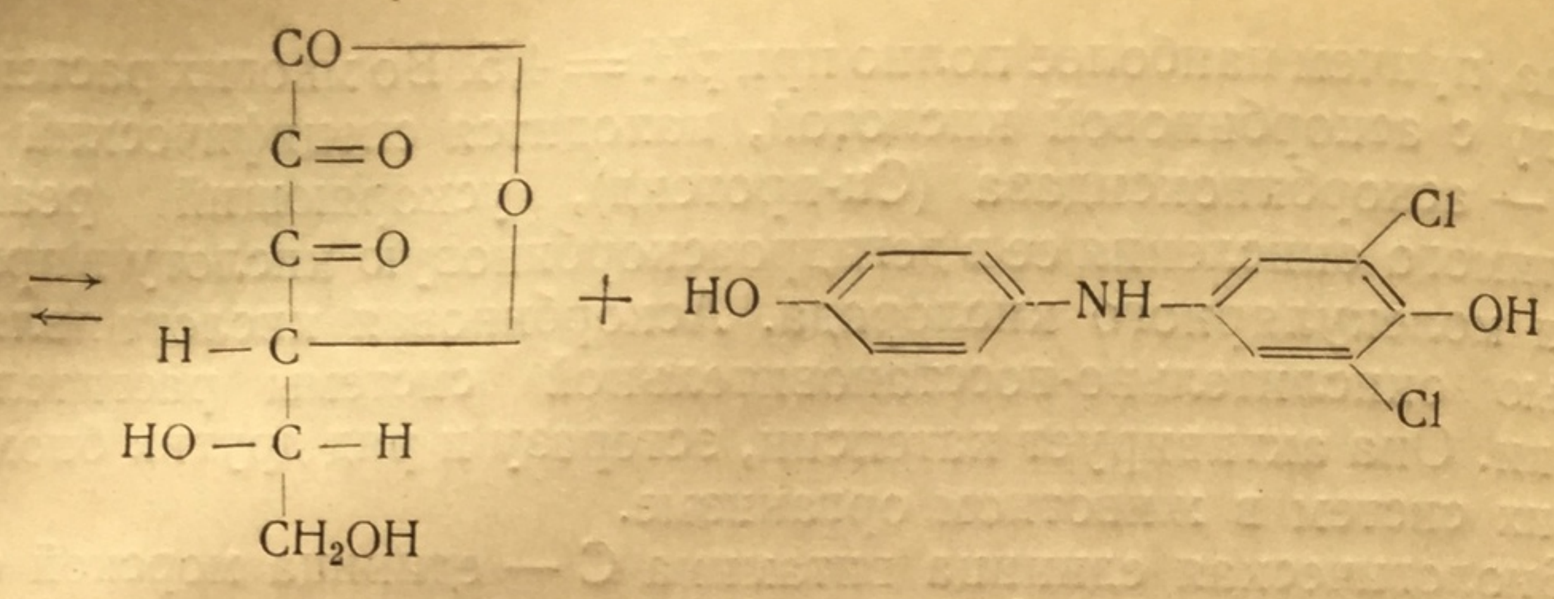
Биологическая единица витамина С — единица морской свинки (МЕ) соответствует 1 мг *l*-аскорбиновой кислоты.

Для качественного и количественного химического определения аскорбиновой кислоты пользуются ее свойствами восстановителя и некоторыми другими реакциями. Аскорбиновая кислота, например, дегидрируется при освещении в присутствии метиленовой синей.



Она восстанавливает в кислом растворе J_2 в HJ и $K_3Fe(CN)_6$ в $K_4Fe(CN)_6$. Аскорбиновая кислота обратимо дегидрируется при действии 2,6-дихлорфенолиндофенола, который при этом превращается в бесцветное лейкосоединение:





2,6-дихлорфенолиндофенол обладает синей окраской в щелочной среде и розовой — в кислой среде. Определение *l*-аскорбиновой кислоты с этим красителем принадлежит к числу наиболее надежных химических методов, если достаточно устранены другие восстановители, мешающие точному определению.

Работа 161. **Качественное открытие витамина С**

Добавляют к нескольким миллилитрам картофельного сока или сока кислой капусты одну каплю свежеприготовленного насыщенного раствора железосинеродистого калия, а затем одну каплю разбавленного раствора хлорного железа. В присутствии аскорбиновой кислоты происходит восстановление $K_3Fe(CN)_6$ в $K_4Fe(CN)_6$, который с трехвалентным железом образует окрашенный в голубой цвет $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ и поэтому появляется синее или зеленоватое окрашивание. При стоянии может образоваться синий осадок. Параллельно ставят контрольный опыт, в котором вместо сока берут дестиллированную воду. Появляется буроватое окрашивание. Затем к нескольким миллилитрам сока добавляют осторожно по каплям свежеприготовленный 0,01 % раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола и наблюдают за обесцвечиванием красителя.

Работа 162. **Количественное определение *l*-аскорбиновой кислоты**

В основе наиболее надежных методов определения *l*-аскорбиновой кислоты лежит титрование с 2,6-дихлорфенолиндофенолом. Однако, простое титрование с этим веществом в применении к биологическим объектам не дает верных результатов, что объясняется прежде всего тем, что некоторые другие вещества, находящиеся в растительных и животных тканях, также как и аскорбиновая кислота, восстанавливают 2,6-дихлорфенолиндофенол. Кроме того, аскорбиновая кислота находится в растительных тканях не только в свободном состоянии, но и в более или менее прочно связанном виде. Поэтому во многих случаях необходима предварительная обработка исследуемого материала для того, чтобы освободиться от белков и от соединений восстановительного характера и добиться возможно полного извлечения аскорбиновой кислоты. Различные

методы, применяемые с этой целью, отличаются приемами, с помощью которых достигается получение содержащих аскорбиновую кислоту экстрактов. Применяют предварительную обработку метафосфорной, трихлоруксусной или сульфосалициловой кислотами, смесью серной и метафосфорной или метафосфорной и фосфорновольфрамовой кислот и другие способы. При таком извлечении и дальнейшем титровании с 2,6-дихлорфенолиндофенолом определяется только «восстановленная» аскорбиновая кислота; дегидроаскорбиновая кислота, содержание которой в зависимости от активности аскорбиноксидазы может достигать 50% общего содержания аскорбиновой кислоты, ускользает от такого определения.

1. Определение аскорбиновой кислоты в крови и моче по способу Девятнина и Иосиковой. Вносят в широкую центрифужную пробирку 4 мл крови или мочи и приливают туда же 8 мл 0,5%-ного раствора уксуснокислого кальция. Затем, при тщательном перемешивании стеклянной палочкой, добавляют 4 мл 25%-ного раствора уксуснокислой ртути. После перемешивания центрифугируют или (в случае мочи) фильтруют жидкость через складчатый фильтр. Фильтрат обрабатывают 5 минут током сероводорода для восстановления окисленной солями ртути аскорбиновой кислоты и для удаления избытка ртути.

Остатки сероводорода затем удаляют пропусканием углекислоты. После этого несколько миллилитров прозрачной и бесцветной жидкости титруют из микробюретки 0,0005 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления ясного и устойчивого розового окрашивания раствора.

Параллельно этому основному опыту ставят контрольный опыт с реактивами и водой без крови или мочи. Израсходованное в контрольном опыте количество миллилитров раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола вычитают из объема, пошедшего в основном опыте

Результаты определения выражают в мг % аскорбиновой кислоты. При расчете следует иметь в виду, что 1 мл 0,0005 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола соответствует 0,044 мг аскорбиновой кислоты.

2. Определение *l*-аскорбиновой кислоты в плазме. Оксалатную или цитратную кровь центрифугируют, отбирают 2 мл прозрачной плазмы и помещают в центрифужную пробирку. Добавляют 4 мл дестиллированной воды и 2 мл 5%-ного раствора вольфрамовокислого натрия. Перемешивают и добавляют 2 мл 0,3 н. раствора серной кислоты, снова перемешивают и через две минуты центрифугируют. 5 мл прозрачного центрифугата (соответствующего 1 мл плазмы) титруют из микробюретки 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания. Одновременно ставят контрольный опыт, в котором вместо плазмы берут 2 мл воды.

Результат титрования в контрольном опыте вычитают из результата основного титрования и по разности находят содержание

аскорбиновой кислоты в плазме, которое выражают в мг%. 1 мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола отвечает 0,088 мг аскорбиновой кислоты. В норме содержание аскорбиновой кислоты в плазме крови человека 1,2 мг%.

3. Определение аскорбиновой кислоты в моче. Добавляют к 10 мл мочи 1 мл 8%-ной уксусной кислоты и 100 мл дестиллированной воды и титруют из микробюретки 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления не исчезающего за полминуты розового окрашивания. Титрование должно быть закончено в течение одной минуты. Из объема, пошедшего на титрование, вычитают результат титрования контрольного опыта с водой вместо мочи.

Результат определения выражают в мг% и вычисляют содержание аскорбиновой кислоты в суточном объеме мочи. В норме человек с мочой выделяет за сутки 25—50 мг аскорбиновой кислоты.

4. Определение аскорбиновой кислоты в растительных материалах. Навеску исследуемого материала (хвоя, шиповник) от 1 до 10 г хорошо растирают с стеклянным порошком и 2%-ной соляной кислотой. Переносят в колбу на 100 мл, доводят до метки 2%-ной соляной кислотой и фильтруют. 10 мл фильтрата титруют 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до розового окрашивания.

СПЕЦИАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА VIII

ХИМИЯ МЯСА

«Мясная пища содержит почти в готовом виде наиболее важные элементы, в которых нуждается организм для своего обмена веществ».

Ф. Энгельс.

Мясо, являющееся важнейшим продуктом питания человека, представляет собою комплекс различных тканей. В состав мяса входят мышечная, соединительная, жировая и костная ткани в следующих относительных количествах (в %):

Мышечная ткань	60—50
Жировая ткань	20—3
Костная ткань	22—15
Соединительная ткань	14—9

Морфологический состав мяса, однако, сложнее, так как мясо содержит, кроме перечисленных, еще небольшие количества нервной ткани и ткани кровеносных сосудов и, наконец, поскольку обескровливание животного не бывает совершенно полным, мясо содержит также и следы крови.

Главная составная часть мяса — мышечная ткань (скелетные мышцы крупного рогатого скота) содержит 70—75% воды, 3—15% жира и 1% золы. Содержание общего азота 2,4—3,8% и содержание белка 15,0—22,0%.

Скелетные мышцы (поперечнополосатые мышцы), образующие мышечную мякоть, построены из пучков мышечных волокон (клеток), наполненных полужидкой саркоплазмой, в которой параллельно одна другой и параллельно оси мышечного волокна, расположены миофибриллы с диаметром около 1 микрона. Эти миофибриллы оптически неоднородны и состоят из чередующихся изотропных и анизотропных участков (полос). Ширина таких полос около 1,5 микрона. Поверхность мышечного волокна состоит из клеточной оболочки (сарколеммы).

Начало исследованию химического состава мышц, в частности мышечных белков, было положено работами А. Я. Данилевского и его учеников. Крупный вклад в изучение мышечных белков сделан Т. Барановским, В. Энгельгардтом и М. Любимовой. Экстрактивные вещества мышц исследовались акад. В. С. Гулевичем и его учениками, а также Н. Толкачевской, И. А. Смородинцевым, А. В. Палладиным, С. Севериным, Д. Фердманом и другими советскими исследователями.

В составе мышечных клеток находятся следующие растворимые белки: миоген, глобулин X, миозин, актин, миохром или миоглобин (растворимый в воде и сходный по своим свойствам с гемоглобином хромопротеид мышцы), нуклеопротеиды клеточных ядер и ферменты: цитохромы, желтый фермент, комплекс ферментов гликолиза, дегидразы, каталаза и другие.

Миоген — белок, растворимый в воде, с изоэлектрическим пунктом при pH=6,5 составляет около 10—20% всех белков мышцы. Глобулин X — белок, извлекаемый солевыми растворами, не выпадающий из раствора при разбавлении водой (при низких концентрациях солей), извлекаемый из мышцы водой и имеющий изоэлектрический пункт при pH=5,2 составляет около 20% всех белков. Миозин (актомиозин), извлекаемый из мышцы солевыми растворами, выпадающий при диализе или разведении водой этих экстрактов и имеющий изоэлектрический пункт при pH=5,5, составляет около 55% всех белков мышцы. Актин — белок, растворимый в воде, образующий комплекс с миозином (актомиозин), составляет около 15% всех белков. Актомиозин, образование которого характеризуется высокой вязкостью растворов, диссоциирует в присутствии солей и АТФ, причем миозин переходит в раствор. Чистый миозин растворим в воде, обладает аденозинтрифосфатазным действием, открытым В. Энгельгардт и М. Любимовой, и составляет около 40% всех белков мышцы. Остальные мышечные белки находятся в незначительных количествах. Приведенное распределение основных фракций мышечных белков не является постоянным и значительно меняется в процессах посмертных изменений мышечной ткани, сопровождающихся переходом части растворимых белков в нерастворимое состояние. В живой мышце миоген и глобулин X входят в состав саркоплазмы, а миозин и актин — в состав миофиброиллей.

Пучки мышечных волокон пронизаны соединительной тканью и мелкими кровеносными сосудами; мышечная ткань, даже тщательно отпрепарированная, всегда содержит некоторое количество соединительной ткани и ткани кровеносных сосудов. В силу постоянного содержания большего или меньшего количества соединительной ткани, в мышце находятся коллаген и эластин, которые, в противоположность собственно мышечным белкам, не содержат достаточного количества «незаменимых» аминокислот и трудно перевариваются при действии пищеварительных ферментов. В табл. 19 приведено сопоставление аминокислотного состава

соединительнотканных белков, целых мускулов и полноценного белка молока — казеина. Содержание отдельных аминокислот дано в процентах при содержании в белке 16,0 г азота.

Таблица 19

Аминокислотный состав белков (в %)

Наименование белков / Наименование аминокислот	Коллаген	Эластин	Мускулы быка	Сердечная мышца	Казеин
Аргинин	8,8	0,9	7,7	7,4	4,2
Гистидин	1,0	—	2,9	2,7	2,5
Лизин	4,5	—	8,1	7,4	7,9
Тирозин	0,3	1,5	3,4	4,4	6,9
Триптофан	0,1	—	1,3	1,4	1,4
Фенилаланин	2,1	3,1	4,9	5,1	5,2
Цистин	0,1— ,2	0,2	1,3	1,2	0,3
Метионин	1,0	0,4	3,3	3,2	3,5
Треонин	1,5	2,5	4,6	4,7	4,1
Лейцин	3,7	—	7,7	8,4	9,9
Изолейцин	1,7	—	6,3	—	6,5
Валин	2,1	—	5,8	6,3	6,7
Глицин	23,6	27,5	5,0	—	0,6
Аланин	9,2	—	4,0	—	2,8
Серин	3,3	—	5,4	5,9	7,5
Глутаминовая кислота	10,3	2,5	15,4	13,3	24,2
Аспарагиновая кислота	5,9	—	6,0	6,9	6,3
Оксипролин	13,0	1,9	—	—	—
Пролин	15,3	14,2	6,0	—	8,0

Из приведенного сопоставления видно, что повышенное содержание в мясе соединительнотканных белков должно снижать его пищевую ценность и поэтому определение в мясе собственно мышечных белков и белков соединительной ткани (коллаген и эластин) важно для установления питательной ценности мяса. В различных мышцах отношение между этими белками очень различно.

аблица 20

Различные фракции белкового азота мяса

Мясо	Общий N (в %)	Белковый N в % к общему N	N мышечных белков в % к белковому N	N коллагена и эластина в % к белковому N
С небольшим содержанием соединительной ткани	3,0	88	82	18
С большим содержанием соединительной ткани	3,6—3,8	93	28	72

Мышцы содержат около 90% белкового и около 10% остаточного азота (в % к общему азоту мышцы). Остаточный азот представляет сумму азота различных азотистых экстрактивных веществ: аммиака, карнозина и ансерина, креатина и креатинфосфорной кислоты (фосфагена), креатинина, карнитина, АТФ, АДФ и адениловой кислот, пуриновых оснований, инозиновой кислоты, таврина, мочевины, метилгуанидина, холина, глутатиона, незначительного количества аминокислот и некоторых других соединений.

Кроме азотистых экстрактивных веществ мышцы содержат и безазотистые экстрактивные вещества: гликоген, молочную кислоту, инозит и различные фосфорные соединения, представляющие промежуточные продукты обмена углеводов. Большая часть определяемого в мышце фосфора относится за счет фосфагена, АТФ, адениловой кислоты, гексозомонофосфата и неорганических фосфатов (ортофосфатов). Содержание гликогена около 0,5—1,0%, а общее содержание редуцирующих сахаров около 30 мг%. Содержание в мышце всех этих соединений в значительной степени зависит от состояния мышцы.

Прижизненные биохимические процессы в мышце, изучавшиеся А. В. Палладиным, В. Энгельгардтом и М. Любимовой, Д. Фердманом, В. А. Белицером и другими советскими исследователями, связаны с физиологическим актом мышечного сокращения и заключаются в реакциях гликолиза, ресинтеза мышечного гликогена, распада и ресинтеза креатинфосфата и АТФ и изменениях сократительного белкового вещества мышцы. При этом молочная кислота, образующаяся при утомлении мышцы, в результате реакций гликолиза при отдыхе мышцы в аэробных условиях частью (около одной пятой) подвергается полному окислительному распаду, а в большей своей части превращается снова в гликоген за счет энергии реакций аэробного окисления. Одновременно с реакциями гликолиза наблюдается распад АТФ и АДФ и затем креатинфосфата, что приводит к накоплению неорганических фосфатов. При отдыхе мышцы происходит ресинтез этих соединений, требующий энергии. Таким образом, наблюдается тесная связь между реакциями анаэробного и аэробного обмена в мышце, выражающаяся в том, что в аэробных условиях в мышце анаэробный распад углеводов протекает замедленно.

Посмертные изменения в мышцах изучены трудами советских ученых. При плюсовых температурах они исследовались И. А. Смородинцевым с сотрудниками и В. И. Соловьевым. Посмертные изменения, происходящие в мышце при низких температурах, изучались С. С. Дроздовым.

Посмертные изменения, происходящие в мышцах при плюсовых температурах уже в течение первых часов после убоя животного, приводят к посмертному окоченению мышцы, вслед за которым наступает разрешение окоченения. При дальнейшем хранении мяса при +1°—+5° в течение нескольких суток заканчивается про-

цесс «созревания» мяса, в результате которого мясо приобретает мягкость, легкую усвояемость, необходимые вкусовые качества и достаточную стойкость при хранении. В основе всех этих изменений лежат ферментативные реакции, протекающие здесь, в противоположность живой мышце, в анаэробных условиях. Ввиду исключения реакций окислительного распада исключаются реакции ресинтеза гликогена и органических фосфорных соединений и уже в первые часы накапливается значительное количество молочной кислоты и ортофосфатов, что, в свою очередь, приводит к резкому изменению нейтральной реакции живой мышцы (близкой к pH=7,0—7,2) в кислую сторону (pH=6,0—6,2), большему, чем то, которое наблюдается при утомлении живой мышцы. Одновременно с этим наблюдается переход значительной части фракции солерастворимых белков в нерастворимое состояние. В дальнейшем, при разрешении окоченения и собственно «созревании» мяса, наблюдается дальнейшее изменение активной реакции в кислую сторону, достигающее к концу созревания pH=5,7—5,8. При этом происходит дальнейшее уменьшение содержания гликогена и прогрессивное накопление неорганического фосфата и редуцирующих сахаров. Содержание молочной кислоты, хотя и медленно, нарастает. Одновременно происходит переход части нерастворимых белков в растворимое состояние, однако, сколько-нибудь глубокого распада белков не наблюдается. Аммиачный азот лишь медленно нарастает от 5—6 до 8—9 мг %. Резкое же увеличение содержания аммиачного азота свидетельствует о начавшихся процессах микробной порчи мяса.

Таблица 21

Изменения в водном экстракте из мяса, „созревающего“ при температуре +4° (по И. А. Смородинцеву)[1]

Время после убоя (в часах)	pH	Гликоген (в мг %)	Общая редуцирующая способность в мг % глюкозы	Молочная кислота (в мг %)	Фосфор неорганический (в мг % P)	Азот вытяжки (в мг %)	Коагулированный азот (в мг %)	Аминоазот (в мг %)	Аммиачный азот (в мг %)
1	6,21	633,7	187,2	319,2	70,5	735,1	516,2	44,13	5,3
3	6,0	—	198,9	314,7	—	706,2	—	49,7	—
6	6,04	—	119,0	465,5	—	736,9	—	51,6	—
9	5,75	—	99,0	512,8	—	847,5	—	51,3	—
12	5,94	462,0	217,0	609,16	77,7	721,6	451,9	48,0	6,65
24	5,56	274,9	249,0	700,6	75,3	800,0	443,5	44,9	8,12
48	5,68	183,1	242,6	692,6	75,4	693,5	476,9	43,7	7,08
72	5,82	189,4	246,1	567,8	91,5	665,0	427,8	41,15	7,31
120	5,68	121,7	289,4	661,3	90,7	123,0	420,2	34,5	6,90
240	5,75	152,4	273,2	650,7	88,1	922,2	446,9	54,0	8,02

[1] Гликоген определялся непосредственно в мясе.

Таким образом, начиная с момента прекращения жизни животного, в мясе происходят непрерывные изменения вначале за счет тканевых ферментов, а позже, при начавшейся порче мяса — за счет ферментов гнилостных микроорганизмов. Эту непрерывную изменяемость состава и свойств мяса следует иметь в виду при всех с ним работах.

За счет высокого содержания полноценных, легко усвояемых белков, мясо является одним из наиболее ценных белковых продуктов питания. Пищевая ценность белков мяса, по сравнению с белками других пищевых продуктов, может быть оценена следующими относительными величинами:

Белки мяса крупного рогатого скота	100
Белки молока	99,6
Казеин	70
Белки картофеля	79
Белки пшеницы	39,6

Однако, по содержанию витаминов мясо не может покрыть потребностей питания человека, как это видно из табл. 22, в которой сопоставлено содержание витаминов в мышце, печени и молоке.

Таблица 22

Содержание витаминов A, C, B_1 и B_2 в мг на 100 г; содержание витамина D в гаммах на 100 г (по Букину)

	A	D	C	B_1	B_2
Мясо крупного рогатого скота	0,12—1,25	—	0,9	0,12—0,24	0,15
Печень крупного рогатого скота	7—12	1,12	20—40	0,3	1—2,5
Молоко коровы	0,4—0,45	0,01—0,25	0,7—2,6	0,04—0,08	0,1
Молоко женское	0,18—0,5	0,05—0,25	3,5—7,0	0,04	—

Значительное влияние на пищевую ценность мяса оказывает также содержание в нем жира, которое в различных сортах мяса сильно колеблется от 3 до 20%. Жир, прежде всего, обладает высокой калорийностью. Если при полном окислении в организме 1 г белков или 1 г углеводов образуется 4,1 ккал., то при таком же окислении 1 г жира выделяется 9,3 ккал. Кроме того, жир мяса содержит ряд жирорастворимых витаминов, а также вещества, участвующие в образовании вкуса и аромата при варке мяса.

Содержание жира, увеличивая пищевую ценность мяса, в то же время приводит к своеобразным явлениям, происходящим в мясе при хранении, так как под действием клеточных ферментов, под действием ферментов плесеней и бактерий, а также и при действии

Таблица 23

Состав говяжьего (темп. плавления 44—50°) и бараньего (темп. плавления 48—52°) жиров (в %)

	Говяжий	Бараний
Миристиновая	2,0—2,5	2,0—4,6
Пальмитиновая	27—29	24—27
Стеариновая	24,5	25—30
Олеиновая	43—44	36
Линолевая	2,6	2,7—4,3
Вакценовая	0,76—1,84	—
Стерины	0,08	0,09
Фосфатиды	Следы	Следы
Витамины	A+D	A+D

света и кислорода воздуха в тканевом жире начинаются изменения, приводящие к его порче. К такого рода изменениям относится прежде всего появление в жире свободных жирных кислот за счет действия на жир клеточных липаз. Кроме того, в мясе некоторых животных, например свиньи, можно обнаружить липоксидазную активность. Под действием липоксидазы и за счет кислорода воздуха в жире образуются перекиси, после чего начинается дальнейшая окислительная порча жира, причем образуются низкомолекулярные кислоты, альдегиды и кетоны, сообщающие жиру неприятный вкус и запах.

Работа 163. Качественное исследование химического состава мышцы

Для работы лучше всего пользоваться мышцами какого-либо лабораторного животного, еще не подвергшимися посмертному окоченению. Для открытия креатинина и молочной кислоты лучше пользоваться мышцами, которые были предварительно подвергнуты раздражению; наоборот, для открытия гликогена следует брать мышцы, находившиеся в покое.

Мышцу тщательно измельчают и экстрагируют двойным объемом воды при встряхивании в течение 30 минут. Экстракт отделяют фильтрованием через марлю и экстракцию повторяют два раза. Водные экстракты соединяют.

Остаток после третьей экстракции водой экстрагируют при встряхивании тройным объемом 10%-ного раствора хлористого аммония (или 5%-ного раствора сернокислого магния) в течение 30 минут и отделяют солевой экстракт мышцы фильтрованием. Остаток ткани сохраняют.

Водный экстракт мышцы делят на две части. В первой части водного экстракта открывают присутствие белка (в водный экстракт переходят: миоген, глобулин X и миохром), определяют высаливаемость белка и делают цветные реакции на белковые аминокислоты. Затем устанавливают присутствие в водном экстракте каталазы и пероксидазы (с реактивом «нади») и отсутствие цитохромоксидазы (с реактивом «нади»; см. работы 34, 37 и 38). В противоположность водному экстракту в остатке мышечной ткани после извлечения водой открывают присутствие цитохромоксидазы.

Вторую часть водного экстракта мышцы освобождают от белка, для чего белок осаждают кипячением при слабокислой реакции и осадок белка удаляют фильтрованием. В фильтрате, свободном от белков, открывают молочную кислоту, креатинин, фосфаты, хлориды и сульфаты.

Для открытия молочной кислоты нижнюю часть пробирки заполняют реактивом, который готовят добавлением к 3 мл 2%-ного раствора фенола нескольких капель 2%-ного раствора хлорного железа до появления фиолетовой окраски. Затем в пробирку приливают исследуемый экстракт. Окраска изменяется из фиолетовой в желтую в присутствии молочной кислоты.

Для открытия креатинина пользуются реакцией с пикриновой кислотой (работа 146). К 1—2 мл исследуемого фильтрата добавляют 3 капли насыщенного раствора пикриновой кислоты и подщелачивают раствор добавлением раствора едкого натра. Через несколько минут появляется оранжево-красная окраска. Нагревание ускоряет реакцию.

Открываемый таким способом креатинин образуется в значительной своей части из мышечного креатина, превращающегося в креатинин при нагревании подкисленного экстракта (при осаждении белков водного экстракта мышцы). Поэтому, если при открытии креатинина реакция не получается достаточно отчетливой, исследуемый фильтрат слабо подкисляют разбавленной серной или соляной кислотой и нагревают около часа на водяной бане (при этом креатин переходит в креатинин; см. работы 146 и 148) и по охлаждении делают цветную реакцию, как указано выше.

Для открытия карнозина (β-аланилгистидина) пользуются реакцией с диазобензолсульфокислотой (см. работу 102 — реакция на гистидин). Для получения диазореактива к 3 мл 0,5%-ного раствора сульфаниловой кислоты в 2%-ной соляной кислоте, при охлаждении льдом, добавляют равный объем 0,5%-ного раствора нитрита натрия и оставляют стоять две-три минуты на льду. Затем 1 мл полученного раствора добавляют к 1 мл исследуемого экстракта из мышцы. Смешивают и добавляют 10%-ный раствор соды до ясной щелочной реакции, причем появляется красное окрашивание.

Для открытия фосфатов, хлоридов и сульфатов пользуются указаниями, сделанными в работе 3.

В солевом экстракте мышцы открывают присутствие белка (миозина или актомиозина). Устанавливают границы высаливания миозина (работа 118), осаждаемость миозина при диализе солевого экстракта и при разведении его водой, высаливаемость хлористым натром. Делают с раствором миозина цветные реакции на белковые аминокислоты.

Остаток ткани после извлечения солевым раствором содержит белки стромы мышечного волокна и белки соединительной ткани. Для открытия коллагена остаток ткани смешивают с трехкратным объемом воды и кипятят около 30 минут, добавляя испаряющуюся воду. Затем горячий раствор отделяют фильтрованием и в фильтрате открывают реакциями осаждения и цветными реакциями присутствие желатины (работа 119). Результат получается особенно ясным с мышцами, содержащими большое количество соединительной ткани.

Для открытия гликогена необходимо извлечение мышцы вести возможно быстро и в условиях, исключающих энзиматический распад гликогена. Это достигается путем извлечения измельченной мышцы четырьмя объемами кипящей воды. Кипячение продолжают 5—10 минут, после чего по охлаждении отфильтровывают жидкость. При добавлении к жидкости нескольких капель раствора иода в иодистом калии появляется красно-фиолетовое окрашивание. Окраска не появляется, если гликоген экстракта подвергнуть гидролизу кипячением в слабокислом растворе или действием амилазы.

Работа 164. **Определение общего, белкового и остаточного азота и азота белков, извлекаемых водой**

При определении общего азота и различных фракций азота мышечной ткани пользуются методом минерализации с последующей отгонкой, улавливанием и определением образующегося в результате минерализации аммиака. Различные модификации этого метода изложены в работах 12 и 134. Можно также пользоваться методом минерализации с последующим определением азота аммиака формольным титрованием (ср. работу 141). В этом случае избегают необходимости в отгонке аммиака. Однако, такой способ применим только в отсутствии солей тяжелых металлов и при удалении фосфатов. Поэтому вместо соли меди в качестве катализатора окисления употребляют двуокись селена, а коллоидные осадки удаляют добавлением коллоидного гидрата окиси железа.

1 г мышцы помещают в небольшую колбу Кьельдаля, добавляют 10—20 мл концентрированной серной кислоты и крупинку двуокиси селена и нагревают при кипении до полного окисления и обесцвечивания. По охлаждении добавляют 50 мл воды и переносят в мерную колбу на 200 мл, споласкивая еще 50 мл воды. К жидкости добавляют 2—3 капли смешанного индикатора (метилрот и метиленовая синяя) и осторожно нейтрализуют добавле-

нием 30%-ного раствора едкого натра до перехода окраски. Затем по охлаждении жидкости в колбу добавляют 5 мл 25%-ного раствора хлорного железа, встряхивают и доводят водой объем до 200 мл. Фильтруют через сухой складчатый фильтр, отбирают 100 мл фильтрата (соотв. 0,5 г мышцы), разбавляют в два раза водой и титруют 0,1 н. NaOH по фенолфталеину до розового окрашивания. Добавляют 5 мл отфильтрованного и нейтрализованного 35%-ного формалина и снова титруют 0,1 н. NaOH до появления розовой окраски. Израсходованное на это титрование число миллилитров 0,1 н. NaOH пересчитывают на азот, имея в виду, что 1 мл 0,1 н. NaOH отвечает 1,4 мг N.

Во многих случаях определения азота можно также пользоваться методом, основанным на выделении аммиака из щелочного раствора и поглощении его титрованной кислотой в закрытом сосуде. Для этого служит широкий цилиндрический сосуд, разделенный внутренней круглой стенкой, не доходящей до края сосуда, на две концентрические части — внутреннюю и внешнюю. Сосуд герметически закрывается притертой стеклянной пластинкой, смазанной вазелином или смесью вазелина, парафина и воска.

Во внутреннюю часть сосуда помещают 1,0 мл 0,01—0,02 н. серной кислоты и 0,1—0,2 мл смешанного индикатора, который готовят смешением равных объемов 1%-ных спиртовых растворов метилрот и метиленовой синей и добавлением к полученной смеси равного объема спирта и двух объемов воды. Затем во внутреннюю часть сосуда помещают 1 мл исследуемого раствора, прикрывают сосуд крышкой, оставив небольшое отверстие, и вносят через это отверстие пипеткой 2 мл 25%-ного раствора едкого натра.

Тотчас плотно закрывают сосуд крышкой, осторожным круговым движением перемешивают содержимое внешней камеры сосуда и оставляют на несколько часов при 20°. После этого титруют избыток несвязанной аммиаком кислоты 0,01—0,02 н. едким натром до перехода окраски из красно-фиолетовой в зеленую.

Для определения белкового и остаточного азота мышцы и азота веществ, извлекаемых из мышцы водой (азота водного экстракта мышцы), 2 г хорошо измельченной мышцы встряхивают в закрытом сосуде с 20 мл дестиллированной воды и сливают жидкость через фильтр в мерную колбу на 100 мл. Экстракцию повторяют еще три раза, остаток ткани переносят на фильтр и промывают водой, собирая промывные воды в ту же колбу. Затем остаток вместе с фильтром минерализуют и определяют азот белков, нерастворимых в воде.

Водный экстракт доводят до объема 100 мл и делят на две равные части. Первую минерализуют и определяют весь азот (белков и остаточный), перешедший в водный экстракт. Вторую смешивают с равным объемом 10—20%-ной трихлоруксусной кислоты и выпавший осадок отфильтровывают и промывают 10%-ной трихлоруксусной кислотой.

Соединенные фильтрат и промывные воды минерализуют и, таким образом, находят остаточный азот.

Разность между азотом водного экстракта и остаточным азотом дает азот извлекаемых водой белков. Сумма же этого последнего и азота не извлекаемых водой белков представляет собою белковый азот мышцы.

Найденные величины азота выражают в процентах к общему азоту мышцы. Обычно белковый азот составляет около 90% общего азота, а остаточный — около 10%.

Работа 165. **Определение различных фракций белкового азота мяса по Миндлиной и Пальмину**

Метод дает возможность определить содержание в мясе азота собственно мышечных белков и азота белков соединительной ткани (коллагена и эластина). В основе метода лежит извлечение белков мышечной ткани солевым раствором и 0,25%-ным раствором едкого натра, после чего из остатка извлекается коллаген нагреванием с водой в виде желатины. Остаток после извлечения коллагена представляет собою эластин.

Для исследуемого мяса определяют предварительно величину общего азота. Затем 10 г хорошо измельченного мяса извлекают в центрифужном стакане последовательно четыре раза по 100 мл 1,2 м. раствора хлористого калия. Жидкость каждый раз отделяют центрифугированием, собирают в мерную колбу и по окончании экстракции доводят до метки раствором хлористого калия. Часть полученного экстракта минерализуют и определяют общий азот солевого экстракта. В другой части определяют остаточный азот (азот экстрактивных веществ). Для этого экстракт подкисляют фосфорной кислотой до слабокислой реакции по метилрот, нагревают до кипения для полного осаждения белков и по охлаждении фильтруют. Фильтрат минерализуют и определяют остаточный азот. Разность между общим азотом солевого экстракта и остаточным азотом дает величину белкового азота водорастворимых и солерастворимых белков (миоген, глобулин X, миозин).

Остаток мяса после солевой экстракции в том же центрифужном стакане заливают 100 мл 0,25%-ного раствора едкого натра, перемешивают и оставляют на 12 часов, после чего отделяют щелочной экстракт центрифугированием. Затем остаток снова заливают 100 мл того же раствора щелочи, перемешивают 20 минут и центрифугируют. Извлечение повторяют еще два раза, полученные центрифугаты соединяют, доводят до определенного объема, часть полученного экстракта минерализуют и определяют азот щелочного экстракта. Затем остаток ткани заливают небольшим количеством воды и нейтрализуют добавлением соляной кислоты по метилрот. Жидкость отделяют центрифугированием и остаток ткани многократно промывают в центрифужном стакане дестиллированной водой. Промывные воды собирают, упаривают, минера-

лизуют, определяют азот и найденную величину присоединяют к азоту щелочного экстракта.

Остаток ткани помещают в стаканчик на 250 мл, заливают 50 мл дестиллированной воды, ставят в автоклав и нагревают два часа при давлении 1,2—1,5 атм. После этого содержимое стаканчика еще горячим фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу на 100 мл, остаток на фильтре промывают горячей водой, которую собирают в ту же колбу. Жидкость в колбе доводят по охлаждении до метки водой, затем часть жидкости минерализуют и, таким образом, определяют азот коллагена.

Остаток с фильтром после отмывания водой минерализуют и определяют азот, который относится, главным образом, за счет эластина. Однако, остаток содержит и некоторое количество не извлеченных полностью щелочным раствором мышечных белков, и поэтому азот эластина находят следующим путем.

10 г измельченного мяса извлекают три раза десятикратным объемом 5%-ного раствора хлористого натрия. Остаток извлекают затем 20 часов десятикратным объемом 0,2%-ного едкого натра. Полученный остаток заливают 100 мл 0,1%-ного раствора едкого натра и кипятят в течение одного часа. По окончании кипячения в жидкости остаются тонкие желтоватые волоконца эластина, которые отделяют центрифугированием, промывают водой и переносят на фильтр, где многократно промывают горячей водой. После этого волоконца эластина вместе с фильтром минерализуют и определяют азот эластина.

Найденную величину азота эластина вычитают из азота остатка, полученного при первом определении (азот эластина и остатки мышечных белков), и разность присоединяют к азоту белков, извлекаемых щелочным раствором.

Найденные величины азота различных белковых фракций и остаточного азота выражают в процентах к общему азоту мяса.

Для мяса, содержащего много мышечной и мало соединительной ткани, через 48 часов после убоя получают в процентах общего азота: 88% белкового азота, 12% остаточного, 18—22% азота солерастворимых белков, 47—48% азота белков, извлекаемых щелочным раствором, 15—19% азота коллагена и 0,6—0,9% азота эластина (при содержании в мясе 3% общего азота). Для мяса, содержащего много соединительной ткани, получают: 93% белкового азота, 7% остаточного, 10% азота солерастворимых белков, 26% азота белков, извлекаемых щелочным раствором, 56% азота коллагена и 0,6% азота эластина (при содержании в мясе 3,7% общего азота). Таким образом, получаемые результаты позволяют судить о содержании в мясе полноценных и неполноценных белков.

Работа 166. **Определение коллагена и эластина в мясе по Воловинской**

10 г измельченного мяса растирают с 50 мл 0,6%-ного раствора хлористого натра и смесь переносят в центрифужную пробирку

смыванием ступки и пестика 50 мл того же раствора хлористого натра. Смесь настаивают в течение часа, а затем центрифугируют 15 минут при 2000—3000 об/мин. Жидкость сливают с осадка, а осадок заливают 100 мл 0,2%-ного едкого натра; на другой день, после тщательного перемешивания, жидкость отделяют на центрифуге. Обработку остатка ткани щелочью производят еще два раза, причем для каждой обработки берут по 50 мл 0,2%-ного едкого натра.

Остаток мясной ткани из пробирки переносят количественно в стакан, смывая его 0,1%-ным едким натром; количество 0,1%-ного раствора едкого натра 100 мл. Стакан ставят на сетку и жидкость нагревают при умеренном кипении в течение 30 минут, по возможности сохраняя объем жидкости в стакане периодическим добавлением горячей воды.

Затем стакан снимают с сетки, дают возможность частичкам ткани осесть на дно стакана и еще в горячем виде жидкость осторожно сливают с осадка в колбу на 200 мл через воронку с небольшим количеством ваты, предварительно проверенной на содержание азота. Остаток в стакане вместе с ватой, через которую производилось фильтрование, обрабатывают водой при кипении. Для этого в стакан наливают 100 мл горячей дестиллированной воды и при умеренном кипении раствор сгущается до $^1/_3$ объема за 1,5—2 часа. Сгущенный раствор некоторое время оставляется в покое и затем жидкость сливается с осадка через вату в ту же колбу на 200 мл. Аналогичным путем обработка остатков мясной ткани водой при кипении проводится еще два раза. После последней экстракции вату промывают водой и промывные воды присоединяют к общему объему экстракта.

Собранный в мерную колбу экстракт подкисляют 20%-ной уксусной кислотой до pH =4,8, нагревают до 50° и после охлаждения доводят водой до метки. При подкислении выпадает небольшое количество белков, от которых освобождаются фильтрованием через бумажный фильтр. Из фильтрата берут 20 мл и после минерализации определяют азот.

Азот коллагена вычисляют следующим образом:

$$N\% = \frac{a \cdot 200 \cdot 100}{20 \cdot B}.$$

где: a — количество азота в 20 мл фильтрата; B — навеска мяса. Полученную величину азота пересчитывают на коллаген умножением на коэфициент 5,55.

Для определения эластина остаток мясной ткани, оставшийся после щелочной и водной экстракции, кьельдализируется вместе с ватой. Полученный здесь азот является азотом эластина. Количество эластина в мясе вычисляется умножением найденного количества азота на коэфициент 6,25.

Работа 167. **Определение миозина (актомиозина) по Соловьеву**

Метод основан на извлечении миозина из мышцы, осаждении его из экстракта, промывке и высушивании осадка и дальнейшем весовом определении. Для экстрагирования миозина пользуются подходящим солевым раствором. Таким раствором может быть раствор, содержащий 0,6 м. KCl, 0,01 м. Na_2CO_3 и 0,04 м. $NaHCO_3$ (pH раствора 9,1) или 0,6 м. раствор NaCl или KCl. Результаты, получаемые с различными экстрагентами, не одинаковы.

В. И. Соловьевым предложен следующий способ определения 8 г охлажденной льдом и измельченной на холоду мышцы помещают в центрифужную пробирку, находящуюся в ледяной воде, и добавляют 25 мл 0,6 м. охлажденного раствора KCl. Перемешивают палочкой 10 минут, центрифугируют и сливают жидкость с осадка через фильтр в мерную колбу на 50 мл. К остатку ткани в центрифужной пробирке снова добавляют 25 мл охлажденного 0,6 м. раствора KCl, быстро перемешивают и снова центрифугируют. Жидкость сливается в ту же мерную колбу.

После того как содержимое мерной колбы достигло комнатной температуры, объем экстракта доводят до метки добавлением 0,6 м. раствора KCl.

10 мл полученного экстракта помещают в центрифужный стакан емкостью 200 мл, прибавляют 10 мл 0,5 м. ацетатного буфера (pH =5,2) и 80 мл дестиллированной воды. Выпавший осадок миозина после некоторого стояния отделяют центрифугированием, промывают водой, количественно переносят на фильтр, высушивают и взвешивают.

Работа 168. **Получение миозина**

Мышцы только что убитого животного тщательно измельчают при охлаждении льдом. 100 г измельченной мышцы экстрагируют 300 мл 0,15 м. фосфатного буфера с pH =6,5, содержащего хлористый калий в 0,3 м. концентрации. Экстрагирование ведут при перемешивании, при $\pm 1°$ в течение 10 минут. Смесь разводят добавлением 1 000 мл воды комнатной температуры и тотчас фильтруют и отжимают через марлю. Фильтрат перемешивают мешалкой до тех пор, пока не произойдет выпадение осадка актомиозина (один-два часа). Выпавший осадок удаляют центрифугированием, после чего к опалесцирующей жидкости при постоянном перемешивании в течение 10 минут добавляют 1 500 мл воды, охлажденной до 0°. После двухчасового стояния при 0° часть жидкости сливается декантацией и затем осадок миозина отделяется центрифугированием. Исследуют растворимость полученного миозина и определяют его изоэлектрический пункт.

Работа 169. Определение изоэлектрического пункта цельной мышцы и ее водного экстракта

Для определения изоэлектрического пункта цельной мышцы пользуются методом набухания. Ввиду невысокой точности метода и возможных ошибок желательны параллельные определения. Однако, при достаточно внимательном и аккуратном проведении эксперимента метод дает вполне достоверные результаты.

Из большого куска отпрепарированной мышцы крупного рогатого скота вырезают пластинку с продольным ходом мышечных волокон. Эту пластинку разрезают в поперечном направлении на кусочки величиной около 1 см² и толщиной 0,5 см, весом около 0,7—1,0 г и размещают в 16 стаканчиков. Каждый кусочек взвешивают на аналитических весах с точностью до третьего знака и после взвешивания в стаканчики наливают по 20 мл цитратно-фосфатных буферных смесей с различными значениями pH, колеблющимися в пределах от 3,0 до 6,0 и отличающимися одно от другого на 0,2 единицы pH. Через 24 часа стояния при комнатной температуре буферные растворы удаляют (желательно контролировать стабильность pH сливаемых буферных растворов) и кусочки осторожно отжимают от остатков жидкости на фильтровальной бумаге очень легким и равномерным надавливанием пальцами. Осушенные кусочки снова взвешивают и определяют изменение их веса (прирост или потеря веса) в процентах к исходному весу. Таким путем получают ряд цифр, дающих величину набухания мышцы в процентах, в зависимости от pH.

pH	Набухание (в %)	pH	Набухание (в %)
3,0	+36	4,6	— 9
3,2	+25	4,8	— 2
3,4	+12	5,0	+ 8
3,6	— 2	5,2	+16
3,8	—16	5,4	+21
4,0	—20	5,6	+26
4,2	—21	5,8	+31
4,4	—17	6,0	+34

Максимальная потеря веса отвечает минимуму набухания при изоэлектрическом состоянии мышцы. Полученные цифровые результаты изображают графически в виде кривой.

Для определения изоэлектрического пункта водного экстракта мышц пользуются методом коагуляции, изложенным в работе 95. Водный экстракт мышцы получают 30-минутным встряхиванием измельченной мышцы с двойным объемом дестиллированной воды и отфильтровыванием полученного экстракта от остатка ткани.

Работа 170. Фракционирование белков водного экстракта мышцы

Для фракционирования белков водного экстракта мышц пользуются в качестве осадителя чистым метиловым алкоголем. Так как осаждение метиловым алкоголем при обычной комнатной температуре сопровождается значительной денатурацией осаждаемого белка, то осаждение необходимо вести при $\pm 1°$. В этих условиях осаждение метиловым алкоголем обратимо и не сопровождается денатурацией; уже при сравнительно незначительном повышении температуры выше указанной, наблюдается значительная денатурация.

Отпрепарированные поперечнополосатые мышцы крупного рогатого скота через час после убоя животного тщательно измельчают и экстрагируют при перемешивании или встряхивании двукратным или четырехкратным объемом дестиллированной воды. Через 40—60 минут жидкость отфильтровывают через марлю и остаток слегка отжимают. Таким образом, получают водный экстракт в виде совершенно прозрачной, красноватоокрашенной жидкости. Для полученного экстракта определяют pH и изоэлектрический пункт (см. работу 169), а затем в 10 мл экстракта определяют содержание общего азота и белкового азота (осаждением с трихлоруксусной кислотой). Если извлечение мышцы водой велось при отношении 1 : 2, то для 10 мл экстракта находят около 36 мг общего и 23 мг белкового азота; при отношении же 1 : 4 в 10 мл водного экстракта содержится около 15 мг общего и около 9,5 мг белкового азота. Обычно азот водного экстракта, полученного указанным способом, состоит из 60—70% белкового и 30—40% остаточного азота.

Полученный водный экстракт охлаждают в холодной камере до $\pm 1°$ и затем смешивают с охлажденными до той же температуры метиловым алкоголем и водой по следующему расчету:

10 мл водного экстракта + (90 — A) мл воды + A мл метилового спирта

Таким образом, получают ряд смесей с содержанием метилового спирта от 10 до 90 об. %. Полученные смеси оставляют в холодной камере при $\pm 1°$ на два часа, после чего белковые осадки отфильтровывают при той же температуре, промывают соответствующей смесью метилового алкоголя и воды и определяют, после минерализации, содержание азота в полученных осадках. Это определение осажденного белкового азота полезно контролировать определением содержания азота в соответствующих фильтратах.

Полученные результаты относят к белковому азоту в 10 мг исходного экстракта и, таким образом, получают количество осажденного белка (при той или иной концентрации метилового алкоголя) в процентах общего содержания белкового азота.

Метиловый спирт (в об. %)	10	15	20	25	30	35	45	50	60	70	80	90
Осаждено белкового N в % к исходному	23	24	29	31	32	33	43	51	78	92	97	99

Цифровые результаты изображают графически, откладывая по оси абсцисс содержание метилового алкоголя в объемных процентах, а по оси ординат — осажденный белковый азот в процентах ко всему белковому азоту экстракта. Получают кривую, показывающую, что водные экстракты скелетных мышц содержат две основных белковых фракции: легче осаждаемую и полностью выпадающую до 25—30 об. % метилового спирта (глобулин X) и труднее осаждаемую, выпадающую до 80 об. % спирта (миоген).

Работа 171. **Определение карнозина по Паршину**[1]

Среди азотистых экстрактивных веществ мышц крупного рогатого скота, составляющих остаточный азот мышцы, карнозин, открытый В. С. Гулевичем, является единственным дипептидом. Поэтому нарастание аминоазота, наблюдаемое при действии дипептидазы на свободный от белка экстракт мышцы, относится исключительно за счет карнозина.

Пользуясь готовым препаратом дипептидазы и теми указаниями, которые сделаны при описании метода в работе 133, определяют содержание карнозина в мышце.

Работа 172. **Определение азота аммиака (азота аммонийных солей) в мышце**

Содержание азота аммиака в мышце только что убитого животного очень не велико (не выше 5—6 мг % N) и лишь незначительно увеличивается в течение посмертных изменений (посмертного окоченения и начальных стадий автолиза), но очень сильно возрастает при развитии гнилостных микроорганизмов (до 30 мг %). Поэтому повышенное содержание азота аммиака свидетельствует о начавшейся порче.

Для определения азота аммиака 8 г тщательно измельченной мышцы помещают в сосуд с отметкой объема 50 мл, добавляют дестиллированной воды до метки и встряхивают в течение 20 минут. Затем фильтруют водный экстракт через сухой полотняный фильтр. Отбирают 25 мл (отвечает 4 г мышцы) в сосуд *В* прибора, изображенного на рис. 18. Добавляют 2—3 капли фенолфталеина и 2—3 капли парафинового масла и присоединяют к прибору.

[1] Другой метод определения карнозина в мясном экстракте разработан К. И. Коковихиной (см. «Биохимия», т. VII, стр. 238, 1942, и диссертацию «К методике количественного определения карнозина в мясном экстракте», 1950).

В сосуд *А* помещают 50%-ную серную кислоту для освобождения просасываемого воздуха от летучих оснований, а в сосуд *Д* помещают 10 мл 0,01 н. серной кислоты, к которой добавлено несколько капель раствора метилрот. Соединяют прибор через предохранительную склянку с водоструйным насосом и вводят в сосуд *В* с помощью воронки насыщенный раствор соды до яркокрасного окрашивания фенолфталеина. Подогревают сосуд *В* с помощью водяной бани до 30° и протягивают воздух через прибор около 1 часа.

Отъединяют сосуд *Д* и титруют избыток несвязанной аммиаком кислоты 0,01 н. едким натром до перехода окраски из розовой в желтую. Израсходованный на титрование объем 0,01 н. едкого натра вычитают из объема взятой 0,01 н. кислоты и, таким образом, узнают количество связанной аммиаком кислоты.

Параллельно, во избежание ошибки за счет содержания аммиачного азота в реактивах, ставят контрольный опыт, в котором вместо водного экстракта берут чистую воду. Количество 0,01 н. серной кислоты, связанной в контрольном опыте, вычитают из результата основного опыта.

Если, например, в результате определения оказались связанными аммиаком 2 мл 0,01 н. серной кислоты, а в контрольном опыте связано аммиаком 0 мл 0,01 н. серной кислоты, то азот аммиака в 25 мл взятого водного экстракта или в 4 г мышцы составит $0{,}14 \times 2 = 0{,}28$ мг, а в 100 г мышцы $0{,}28 \times 25 = 7{,}0$ мг.

Следовательно, содержание аммиачного азота в исследуемой мышце 7,0 мг %.

Работа 173. **Определение гликогена в мышце**[1]

Метод основан на полном разрушении при нагревании в щелочном растворе белковой части мышечных клеток, после чего гликоген, перешедший в раствор и устойчивый к действию щелочи, осаждается добавлением спирта, отделяется, промывается и после растворения в воде подвергается полному гидролизу в кислом растворе. Образовавшаяся глюкоза определяется как редуцирующий сахар и найденное количество глюкозы пересчитывается в гликоген.

Навеску 0,5—1,0 г хорошо измельченной и, по возможности, свободной от жира мышечной ткани помещают в центрифужную пробирку, добавляют 5 мл 60%-ного раствора едкого калия и помещают пробирку в кипящую водяную баню на один-два часа. Время от времени встряхивают содержимое пробирки. По охлаждении добавляют 5 мл воды и затем 40 мл спирта и 5 мл 1%-ного раствора сульфата натрия и оставляют на несколько часов для полного осаждения гликогена. Жидкость центрифугируют, удаляют жидкость над осадком пипеткой, осадок смешивают с 15 мл спирта, снова центрифугируют и удаляют спирт. Такую промывку

[1] Метод определения гликогена в крови и тканях предложен также А. М. Кузиным («Биохимия» т. IX, стр. 14, 1944).

спиртом повторяют еще два раза и затем промывают осадок эфиром. После удаления эфира высушивают осадок в пробирке на водяной бане.

К полученному осадку гликогена в пробирке добавляют 10 мл воды, нейтрализуют раствор прибавлением кислоты и затем, добавив 15 мл 2—2,5%-ной соляной кислоты, помещают пробирку в кипящую водяную баню на два-три часа. Полученный гидролизат количественно переносят в мерную колбу на 200 мл, добавляют водой до метки и для определения редуцирующего сахара берут 10 мл жидкости.

Определение редуцирующего сахара ведут или по восстановлению $K_3Fe(CN)_6$ (см. работу 65), или по описываемому в работе 174 методу Широкова и Воловинской.

10 мл разбавленного гидролизата нейтрализуют осторожным добавлением разбавленной щелочи, добавляют 2 мл щелочного 0,005 н. раствора $K_3Fe(CN)_6$ и нагревают смесь на кипящей водяной бане 15 минут. По охлаждении добавляют 3 мл раствора иодистого калия (см. работу 65), смешивают и подкисляют добавлением 2 мл 3%-ной уксусной кислоты. Добавляют 2 капли 1%-ного раствора крахмала в насыщенном растворе хлористого натрия и титруют выделившийся иод 0,005 н. раствором тиосульфата до исчезновения синей окраски.

Делают два параллельных определения и, кроме того, ставят контрольный опыт с одними реактивами. Если при титровании контрольного опыта истрачено 1,97 мл раствора тиосульфата, что по таблице (см. работу 65) отвечает 0,005 мг глюкозы, а при титровании основных опытов истрачено 0,97 мл раствора тиосульфата, что отвечает 0,182 мг глюкозы, то глюкозы в 10 мл исследуемого раствора : 0,182—0,005 = 0,177 мг. Если была взята навеска мышечной ткани 0,6 г, то во всей взятой навеске глюкозы $\frac{0,177 \cdot 200}{10 \cdot 0,6} = 5,9$ мг, а в 100 г мышцы $5,9 \times 100 = 590$ мг глюкозы. Это количество глюкозы отвечает $590 \times 0,9 = 531$ мг % гликогена.

Работа 174. **Определение гликогена и редуцирующего сахара по Воловинской и Широкову**

Метод основан на разрушении белковой части мяса действием крепкой щелочи, после чего гликоген осаждается из раствора спиртом. Отделенный гликоген переводят нагреванием с разбавленной кислотой в глюкозу. Глюкоза определяется количественно окислением периодатом по Воловинской и Широкову. По количеству глюкозы вычисляют содержание гликогена в мясе, пользуясь коэфициентом 0,927.

В центрифужную пробирку с коническим концом, содержащую 5 мл 60% раствора едкого натрия, вносят 2,5—3 г измельченного мяса и нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 минут. После охлаждения в пробирку добавляют 5 мл дестиллированной

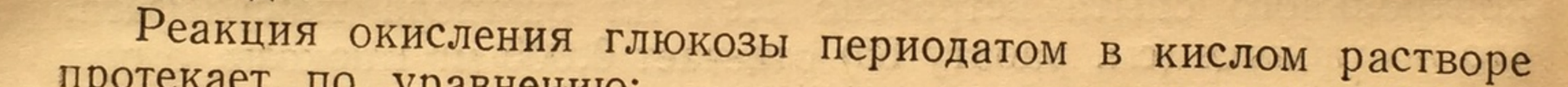
воды и при тщательном перемешивании стеклянной палочкой осаждают гликоген 40 мл 96°-ного спирта. Для ускорения осаждения гликогена вносят в пробирку несколько капель концентрированной серной кислоты. Образующийся при этом сернокислый натрий, выпадая в осадок, способствует осаждению гликогена.

Пробирку оставляют стоять 24 часа, а затем после получасового центрифугирования жидкость над осадком осторожно удаляют пипеткой или тонким сифоном. Осадок последовательно промывают 60°, 70°, 80°, 90° и, наконец, 96°-ным спиртом, беря каждый раз по 15 мл, и, наконец, эфиром. После центрифугирования спирт и эфир удаляют из пробирки пипеткой или сифоном, а остатки эфира удаляют испарением на водяной бане.

К осадку гликогена добавляют 3—5 мл горячей дестиллированной воды и, перемешивая раствор, нейтрализуют его по лакмусу, сначала 2 каплями концентрированной соляной кислоты, а затем 2,2%-ным раствором. В пробирку вносят затем 30 мл 2,2%-ного раствора соляной кислоты и гидролизуют гликоген на кипящей водяной бане в течение трех часов.

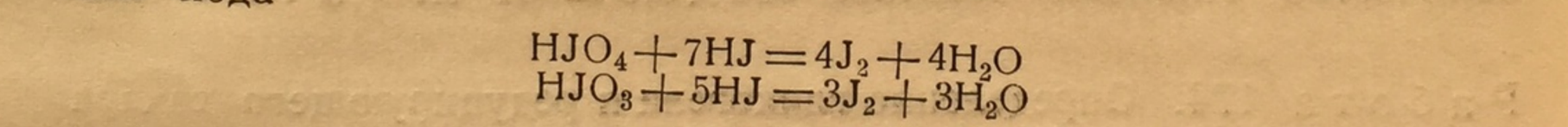
Содержимое пробирки количественно переносят в мерную колбу на 250 мл, доводят дестиллированной водой до метки и определяют глюкозу по методу В. П. Воловинской и Н. В. Широкова. Этот метод, применимый для определения различных редуцирующих сахаров, основан на том, что периодат в кислой среде количественно окисляет глюкозу до муравьиной кислоты и формальдегида.

Реакция окисления глюкозы периодатом в кислом растворе протекает по уравнению:



$$C_6H_{12}O_6 + 5HJO_4 = 5HJO_3 + 5HCOOH + HCOH.$$

Взятый для определения избыток периодата и образовавшийся в результате реакции иодат определяются, после добавления иодистого калия, в виде эквивалентного количества выделившегося иода



$$HJO_4 + 7HJ = 4J_2 + 4H_2O$$
$$HJO_3 + 5HJ = 3J_2 + 3H_2O$$

титрованием раствором тиосульфата. По количеству израсходованного на окисление периодата вычисляют количество окисленной глюкозы. Так как на каждую молекулу глюкозы расходуется пять молекул HJO_4, что соответствует расходу 10 эквивалентов иода, то, очевидно, что 1 мл 0,01 н. раствора периодата или 1 мл 0,01 н. раствора тиосульфата отвечает 1,801:10 = 0,1801 мг глюкозы.

Необходимый для определения 0,01 н. раствор периодата готовят из кристаллического периодата натрия $Na_2H_3JO_6$ (молекулярный вес 272), который в кислой среде выделяет HJO_4:

$$Na_2H_3JO_6 + H_2SO_4 = Na_2SO_4 + HJO_4 + 2H_2O.$$

Берут навеску 0,170 г периодата натрия ($Na_2H_3JO_6$) и вносят в мерную колбу емкостью 500 мл. Приливают дестиллированной воды около 200 мл и 5 мл 4 н. серной кислоты и энергичным встряхиванием добиваются полного растворения осадка. Доводят объем раствора водой до 500 мл. Если раствор мутноват, фильтруют через стеклянный фильтр. Для отмеривания этого раствора пользуются микробюреткой на 2 мл с делениями на 0,01 мл. Выше нулевого деления микробюретки припаян шарик с объемом 6 мл и, таким образом, общий объем микробюретки составляет 8 мл. Количество глюкозы в испытуемом растворе должно быть таким, чтобы после реакции в растворе оставался некоторый избыток периодата. При этом следует иметь в виду, что, если на титрование слепого опыта (без глюкозы) расходуется около 8 мл 0,01 н. тиосульфата, то при титровании опыта с глюкозой будет израсходовано не менее 6 мл 0,01 н. тиосульфата, так как на титрование иодата, образующегося при раскислении периодата, требуется 0,75 тиосульфата, расходуемого на периодат. Предельное количество глюкозы, определяемое при применении 8 мл 0,01 н. раствора периодата — 0,35 мг.

В пробирки диаметром 25—28 мм и длиною 12 см отмеривают 8 мл 0,01 н. раствора периодата, 2 или 5 мл исследуемого раствора глюкозы и 2 мл 10%-ной серной кислоты. Параллельно ставят контрольный (слепой) опыт, в котором вместо раствора глюкозы берут 2 или 5 мл воды.

Пробирки ставят на кипящую водяную баню, через 15 минут охлаждают холодной водой и, добавив в каждую пробирку по 3 мл 5%-ного раствора иодистого калия, титруют выделившийся иод 0,01 н. раствором тиосульфата, добавляя к концу титрования 5 капель 0,5%-ного раствора крахмала в качестве индикатора.

На основании полученных результатов, по содержанию редуцирующего сахара (глюкозы) вычисляют количество гликогена в исследуемом мясе следующим образом:

$$\frac{0{,}927 \cdot 0{,}1801\,(a - b)\,250 \cdot 100}{A \cdot B}\ \text{мг}\ \%,$$

где: 0,927 — коэфициент для пересчета глюкозы в гликоген;

0,1801 — количество миллиграммов глюкозы, соответствующее 1 мл 0,01 н. раствора тиосульфата;

(a — b) — разность в мл 0,01 н. раствора тиосульфата, израсходованного в слепом и основном опыте;

A — навеска мяса;

B — количество миллилитров раствора глюкозы, взятое для определения.

Работа 175. Определение общего и неорганического фосфора в мясе по Широкову

Общий фосфор мышцы представляет собою сумму неорганического фосфора (ортофосфаты) и органического фосфора, т. е.

фосфора, входящего в состав аденозинтрифосфорной, аденозиндифосфорной, аденозинмонофосфорной (адениловой) кислот, фосфагена (фосфокреатина), фосфора содержащих остаток фосфорной кислоты промежуточных продуктов гликолиза, фосфора фосфолипоидов (например, фосфатидов) и фосфора нуклеопротеидов. При обработке измельченной мышцы раствором трихлоруксусной кислоты в экстракт переходят неорганические фосфаты и некоторые растворимые в растворе трихлоруксусной кислоты органические соединения фосфора. Для определения неорганических соединений фосфора в таком экстракте пользуются колориметрическим методом, основанным на том, что только неорганические фосфаты образуют с молибденовокислым аммонием комплексное соединение, которое при восстановлении бисульфитным раствором нитрозобетанафтола переходит в окрашенное в синий цвет соединение (молибденовую синь). Полученную окраску сравнивают в колориметре с окраской, полученной тем же способом с стандартным раствором фосфата (KH_2PO_4), концентрация которого отвечает содержанию 0,1 мг P_2O_5 в 1 мл и, таким образом, находят содержание фосфатов в исследуемом экстракте.

Если экстракт трихлоруксусной кислоты предварительно подвергнуть минерализации, а затем определить содержание фосфора, то определяется так называемый кислоторастворимый фосфор, т. е. неорганический фосфор и фосфор органических соединений, перешедших в экстракт при обработке мышцы трихлоруксусной кислотой (см. работу 9).

Для определения неорганического фосфора в толстостенный химический стакан на 100 мл берут навеску около 2,5 г измельченного мяса. Добавляют 10 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты и растирают несколько минут стеклянной палочкой. Жидкость сливают в сухую колбу. Снова добавляют к мясу 10 мл раствора трихлоруксусной кислоты, перетирают палочкой и экстракт снова сливают в ту же колбу. Эту операцию повторяют еще три раза и, таким образом, на экстрагирование употребляют точно 50 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты.

Собранный экстракт фильтруют через небольшой бумажный фильтр. Отбирают 25 мл фильтрата, переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят водой до метки. 8 мл этого раствора употребляют для колориметрирования.

Для колориметрирования необходимы следующие реактивы:

I. Кислый раствор молибденовокислого аммония. Смешивают перед употреблением объем раствора 25 г молибденовокислого аммония в 1000 мл воды с равным объемом 5 н. серной кислоты.

II. Бисульфитный раствор нитрозобетанафтола. 15 г кислого сернистокислого натрия и 0,5 г среднего сульфита натрия растворяют в 50 мл воды. В этом растворе растворяют 0,25 г нитрозобетанафтола и доводят водой до объема 100 мл. Перед употреблением один объем полученного раствора смешивают с четырьмя объемами воды.

III. Стандартный раствор фосфата калия (KH_2PO_4) · 0,1916 г однометалльного фосфата калия растворяют в воде, добавляют 10 мл 0,1 н. серной кислоты и доводят раствор водой до 1 000 мл. 1 мл такого раствора содержит 0,1 мг P_2O_5.

Для получения окраски 8 мл трихлоруксусного экстракта помещают в мерную колбу на 25 мл, добавляют 10 мл кислого раствора молибденовокислого аммония, 5 мл бисульфитного раствора нитрозобетанафтола и доводят водой до объема 25 мл.

Одновременно и в тех же условиях готовят такую же смесь из стандартного раствора фосфата. Для этого в колбу на 25 мл вносят 2 мл стандартного раствора фосфата, 2,5 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты, 10 мл кислого раствора молибденовокислого аммония, 5 мл бисульфитного раствора нитрозобетанафтола и доводят водой до объема 25 мл.

Обе колбы одновременно ставят в водяной термостат при 37° и через 5 минут вынимают, охлаждают до комнатной температуры и колориметрируют.

Если, например, при колориметрировании в колориметре Дюбоска, равная окраска обеих половин поля зрения наблюдается при соотношении высоты столба жидкости стандартного раствора к высоте столба жидкости опыта = 1,1, то содержание неорганического фосфора во взятой навеске мяса будет:

$$\frac{1{,}1 \cdot 0{,}1 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 50}{8 \cdot 25} = \text{мг } P_2O_5.$$

Если была взята навеска 2,500 г, то содержание фосфора в виде P_2O_5 в исследуемом мясе в мг % будет:

$$\frac{1{,}1 \cdot 0{,}1 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100}{8 \cdot 25 \cdot 2{,}500} = 220 \text{ мг\%} \ P_2O_5 .$$

При определении общего фосфора измельченную мышечную ткань подвергают полной минерализации и только после этого в полученном растворе колориметрически определяют весь фосфор в виде фосфата. По Широкову минерализацию мяса ведут следующим образом. Берут навеску мяса около 0,4—0,6 г, помещают в кьельдалевскую колбу на 50 мл и заливают 3 мл серной кислоты (уд. веса 1,84) и 2 мл азотной кислоты (уд. веса 1,4). Минерализацию ведут при слабом нагревании, причем выделяются окислы азота. Нагревание прекращают при появлении белых паров. Колбе дают несколько остыть и осторожно вносят в нее около 0,5 мл концентрированной азотной кислоты. В дальнейшем нагревание колбы чередуют с внесением небольших количеств азотной кислоты. При нагревании избегают сильного потемнения жидкости. Добавление азотной кислоты прекращают после того, как жидкость в колбе продолжает оставаться бесцветной или слабо окрашенной в желтый цвет при кипячении в течение 15—20 минут (после удаления из колбы окислов азота). В дальнейшем полное

обесцвечивание достигается периодическим, по каплям, добавлением в него 30%-ной перекиси водорода. Колбе дают остыть, затем осторожно вносят 10 мл воды и кипятят 10—15 минут для разрушения нитрозосерной кислоты. Содержимое количественно переносят в колбу на 100 мл и доводят водой до метки. Из этого раствора берут 5 или 8 мл для колориметрирования.

Другой метод минерализации заключается в нагревании навески мяса с 5 мл концентрированной серной кислоты, причем после испарения воды продолжают нагревание и периодически добавляют по 0,5 мл, а к концу минерализации по каплям — 30%-ную перекись водорода. Минерализацию прекращают, когда в течение 15-минутного нагревания не наблюдается потемнения жидкости. Жидкость по охлаждении переносят в мерную колбу, добавляя воду, и кипятят 10—15 минут. По охлаждении осторожно нейтрализуют жидкость раствором едкого натра и, охладив колбу, доводят водой до метки. Из полученного раствора берут 5 или 8 мл для колориметрирования.

Для получения окраски берут 5 мл полученного раствора и помещают в мерную колбу на 25 мл. Добавляют 10 мл кислого раствора молибденовокислого аммония, 1 мл 0,1 н. раствора перманганата, 5 мл бисульфитного раствора нитрозобетанафтола и доводят водой до объема 25 мл.

Одновременно готовят смесь из стандартного раствора фосфата. Для этого в колбу на 25 мл вносят 2 мл стандартного раствора фосфата, 10 мл кислого раствора молибденовокислого аммония, 1 мл 0,1 н. раствора перманганата, 5 мл бисульфитного раствора нитрозобетанафтола и доводят водой до объема 25 мл.

Обе колбы одновременно ставят в водяной термостат при температуре 37° и через 5 минут вынимают, охлаждают до комнатной температуры и колориметрируют.

Если, например, при колориметрировании в колориметре Дюбоска, равная окраска обеих половин поля зрения наблюдается при соотношении высоты столба жидкости стандартного раствора к высоте столба жидкости опыта = 0,8, то содержание фосфора во взятой навеске мяса будет:

$$\frac{0{,}8 \cdot 0{,}1 \cdot 2{,}0 \cdot 100}{5} = \text{мг } P_2O_5.$$

Если была взята навеска 0,60 г, то содержание общего фосфора в виде P_2O_5 в исследуемом мясе в мг % будет:

$$\frac{0{,}8 \cdot 0{,}1 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{5 \cdot 0{,}60} = 533 \text{ мг\%} \ P_2O_5.$$

Содержание различных фракций фосфора в мясе подвержено значительным колебаниям. В среднем общего фосфора около 500—550 мг % P_2O_5, кислоторастворимого около 440—460 мг % P_2O_5 и неорганического — 200—250 мг % P_2O_5.

Работа 176. **Определение аскорбиновой кислоты в мясе**

К 2 г хорошо измельченной мышце в центрифужной пробирке добавляют дестиллированной воды до объема 6 мл, хорошо перемешивают и полученную смесь обрабатывают, как это указано для плазмы крови в работе 162.

Содержание аскорбиновой кислоты в бычьей мышце около 0,8—0,9 мг %.

Работа 177. **Определение жира в мясе**

Для определения содержания липоидов обезвоженное тем или иным способом мясо подвергают экстракции петролейным эфиром, диэтиловым эфиром или смесью эфира и спирта. По потере веса после экстракции вычисляют содержание жира в мясе в процентах.

Для обезвоживания мяса навеску перетирают с прокаленным песком или стеклом и затем высушивают при температуре около 100—105° или же смешивают навеску мяса с гипсом или двуводным фосфатом, которые обезвоживают ткань за счет образования кристаллогидратов.

Берут навеску около 2—3 г измельченного мяса в тарированный стаканчик, содержащий прокаленный до постоянного веса песок.

Стеклянной палочкой перетирают мясо с песком и ставят в сушильный шкаф. Высушивание ведется до постоянного веса, причем параллельно обычно определяется содержание воды во взятом мясе.

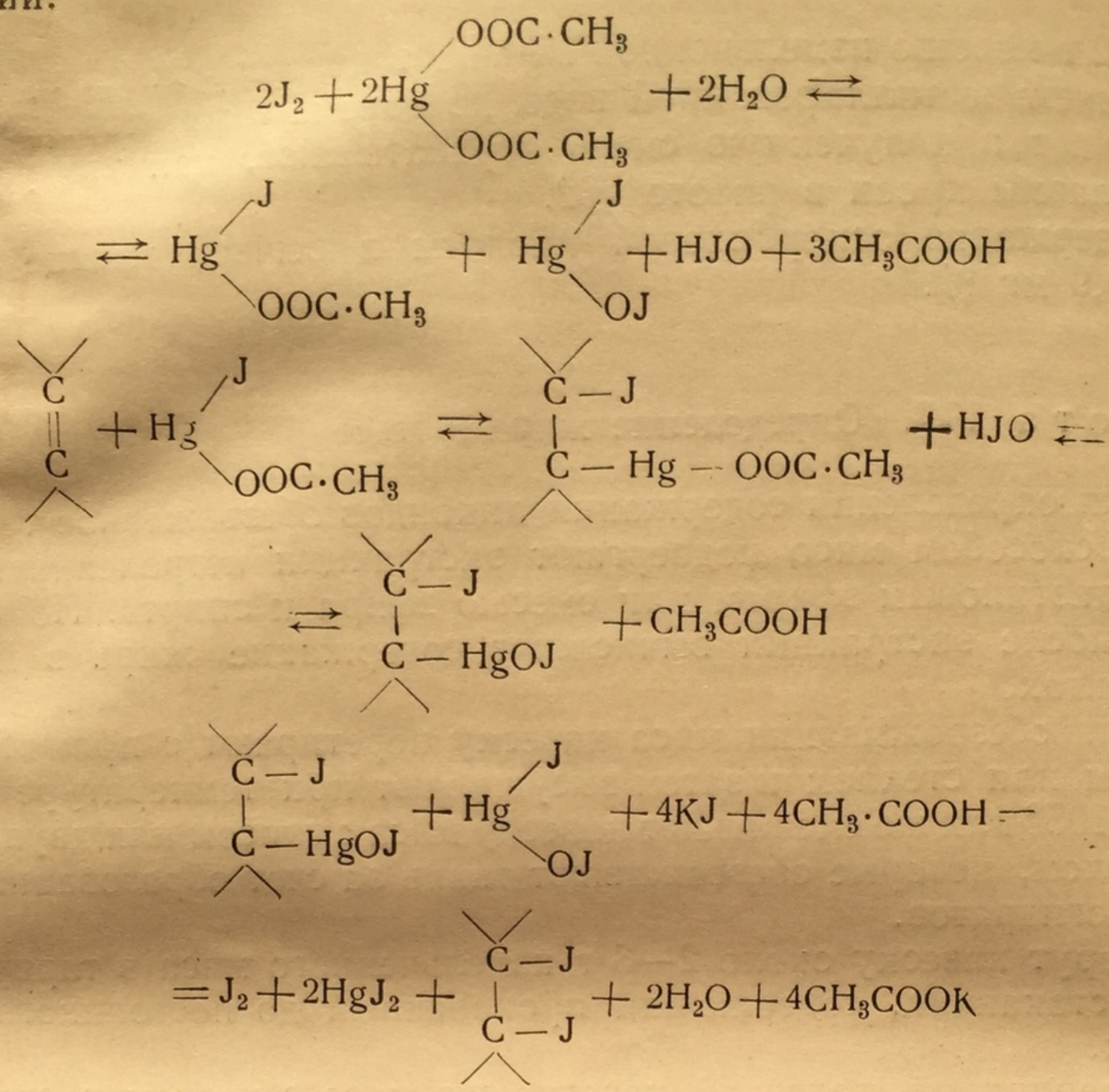
Сухой остаток после перетирания палочкой количественно переносят в гильзу из бумаги, экстрагированной эфиром и высушенной до постоянного веса. Гильзу затем взвешивают и помещают в экстрактор аппарата Сокслета для извлечения жира и экстрагируют эфиром или петролейным эфиром при легком кипении в течение 10—12 часов. Гильзу вынимают из экстрактора, высушивают до постоянного веса и по разности (потере) веса находят содержание жира во взятой навеске мяса.

Эфир из экстрактора переносят в маленькую колбу и отгоняют эфир. В остатке экстрагированный жир. С ним делают качественные реакции на обнаружение глицерина (см. работу 70) и определяют рефракцию (см. работу 73).

Работа 178. **Определение иодного числа жира**

Кроме способа, изложенного в работе 76, для определения иодного числа жира может быть применен метод, основанный на присоединении иода к ненасыщенным связям жирных кислот

в присутствии ацетата ртути. В основе метода лежат следующие реакции:



0,3—0,4 г жира помещают в коническую колбу с притертой пробкой и растворяют в 10—15 мл чистого бензола. Добавляют, точно отмеривая из бюретки, 25—35 мл раствора иода в бензоле (25 г иода в 1 000 мл бензола). После смешивания в колбу вносят 9 мл свежеприготовленного 10%-ного раствора ацетата ртути в 97—98%-ной уксусной кислоте. Смешивают и оставляют стоять 10 минут. После этого добавляют 20 мл 20%-ного раствора иодистого калия, хорошо встряхивают, разбавляют 50—100 мл воды и титруют 0,1 н. раствором тиосульфата в присутствии крахмала до исчезновения голубой окраски.

Параллельно ставят слепой опыт без жира. Разность между расходом 0,1 н. раствора тиосульфата в слепом опыте и опыте с жиром отвечает количеству присоединенного к жиру иода. Если эта разность равна *a* мл 0,1 н. раствора тиосульфата, то искомое иодное число равно 1,2693, умноженному на *a* и деленному на взятую навеску жира.

Работа 179. **Определение кислотности жира и проба на появление кислотности в жире с нейтральной красной**

Одним из признаков, сопровождающих различные виды порчи тканевого жира, является образование свободных кислот.

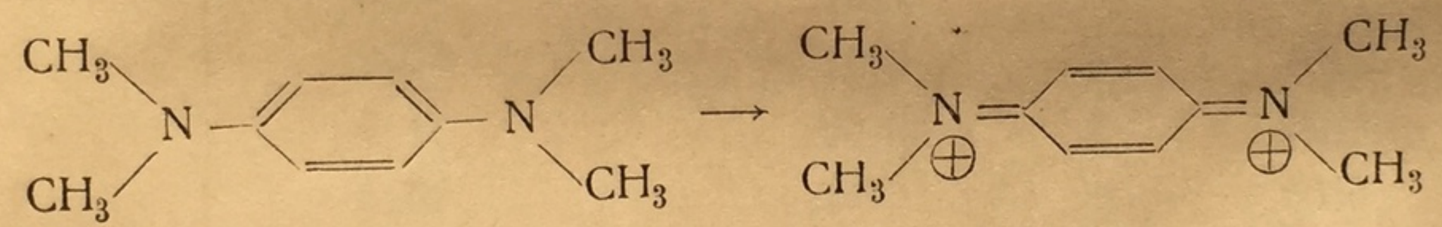
Благодаря этому по увеличению кислотности жира, который вначале совершенно нейтрален, можно судить о его прогрессирующей порче. Появляющуюся в жире кислотность можно определить количественно. Метод определения кислотности изложен в работе 74. Для быстрого открытия образующихся в жире, при порче, кислот может служить реакция с нейтральной красной — индикатором, меняющим свою окраску при изменении кислотности из зеленовато-желтой в красную.

0,25—0,5 г исследуемого жира тщательно растирают небольшим шпателем на дне широкой фарфоровой чашки с 0,5—1,0 мл 0,01%-ного раствора нейтральной красной в водопроводной воде.

Излишек раствора красителя сливают и наблюдают за окраской, которую принял жир. Совершенно свежий жир имеет при этом зеленовато-желтую окраску, жир с очень малой кислотностью — коричневато-желтую окраску и жир испорченный с относительно высокой кислотностью имеет коричневую до красноватой окраску.

Работа 180. **Качественное определение перекисей в жире по Кульбергу и Сойферу**

Органические перекиси, как и перекись водорода, не способны сами по себе окислить *N,N'*-тетраметил-*p*-фенилендиамин, но в присутствии солей закисного железа в качестве катализатора это окисление тотчас наступает.



В пробирку с притертой пробкой вносят 1 г исследуемого жира, добавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты, 2 капли 0,01%-ного раствора соли Мора и 10 капель 0,01%-ного раствора *N,N'*-тетраметил-*p*-фенилендиамина в ацетоне. Помещают пробирку на 5 секунд в кипящую водяную баню и затем хорошо встряхивают. В случае присутствия в жире перекисей нижний слой окрашивается в сине-фиолетовый цвет.

Работа 181. **Наблюдение над окислением жира при действии липоксидазы**

Жир мяса при хранении подвергается процессам, приводящим к его порче как за счет действия ферментов бактерий и плесеней, так и при действии клеточных ферментов: липаз и липоксидаз. Действие последних приводит к первичному образованию перекисей у ненасыщенных жиров. Для наблюдения действия липоксидазы свиного мяса ставят следующий опыт.

Берут три широких пробирки и помещают в каждую по 2 г свежеполученного, совершенно свободного от перекисей, свиного

жира и помещают все пробирки в термостат при температуре 35—40°. Отсутствие перекисей должно быть установлено с помощью количественного метода определения перекисей (см. работу 78). Затем в каждую из пробирок помещают по 0,5 мл фосфатной буферной смеси с pH =7,0. После этого одновременно в первую пробирку помещают 0,5 мл воды, во вторую — 0,5 мл раствора соевой липоксидазы (см. работы 81 и 82) и в третью 0,5 мл водного экстракта (1 : 2) свиного мяса. Содержимое всех трех пробирок энергично перемешивают с помощью мешалок и через 30—60 минут вынимают из термостата, в каждую пробирку добавляют по 5 мл хлороформа и содержимое пробирок переносят в три делительных воронки. Отделяют хлороформенный слой и вторично экстрагируют смеси в делительных воронках 5 мл хлороформа. Хлороформенный слой также сливают и соединяют с первым хлороформенным экстрактом. После этого каждые 10 мл хлороформенного раствора делят пополам и в таких двух параллельных пробах (для каждого опыта с жиром) определяют количественно содержание перекисей (см. работу 78). Сопоставляют накопление перекисей в трех поставленных опытах (первый служит контролем).

ПРИГОТ

1. Буфе
фатных
Фосфа
соответствую
ра KH_2PO_4,

№ смеси
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

Для по
$\cdot 2H_2O$ в 1
Для получ
прокипяче
в склянка
воздуха.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ РЕАКТИВОВ И ПРЕПАРАТОВ

1. Буферные смеси. Приготовление цитратно-фосфатных буферных смесей описано в работе 15.

Фосфатные буферные смеси готовят смешением соответствующих объемов м./15 раствора Na_2HPO_4 и м./15 раствора KH_2PO_4, как это указано в табл. 24.

Таблица 24

Фосфатные буферные смеси

№ смеси	pH смеси	мл м./15 раствора Na_2HPO_4	мл м./15 раствора KH_2PO_4
1	4,94	1,0	99,0
2	5,29	2,5	97,5
3	5,59	5,0	95,0
4	5,91	10,0	90,0
5	6,24	20,0	80,0
6	6,47	30,0	70,0
7	6,64	40,0	60,0
8	6,81	50,0	50,0
9	6,98	60,0	40,0
10	7,17	70,0	30,0
11	7,38	80,0	20,0
12	7,73	90,0	10,0
13	8,04	95,0	5,0
14	8,34	97,5	2,5
15	8,67	99,0	1,0
16	9,18	100,0	1,0

Для получения м./15 Na_2HPO_4 растворяют 11,876 г $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ в 1000 мл хорошо прокипяченной дестиллированной воды. Для получения м./15 KH_2PO_4 растворяют 9,078 г соли в 1 000 мл прокипяченной дестиллированной воды. Растворы сохраняют в склянках, защищенных от проникновения углекислоты из воздуха.

Ацетатные и аммонийные буферные смеси готовят смешением соответствующих 0,1 н. растворов в соотношении, указанном в табл. 25.

Таблица 25

Ацетатные и аммонийные буферные смеси

Отношение объемов 0,1 н. растворов	$\frac{0,1\ н.\ NH_4Cl}{0,1\ н.\ NH_3}$ pH	$\frac{0,1\ н.\ CH_3 \cdot COOH}{0,1\ н.\ CH_3COONa}$ pH
97:3	8,0	3,19
94:6	8,3	3,3
89:11	8,58	3,8
80:20	8,89	4,1
66,7:33,3	9,19	4,4
50:50	9,5	4,7
33,3:66,7	9,8	5,0
20:80	10,1	5,3
11:89	10,4	5,6
6:94	10,7	5,9
3:97	11,0	6,22

2. Вольфрамата натрия ($NaWO_4 \cdot 2H_2O$) раствор. Для осаждения белков пользуются 10%-ным раствором вольфрамата натрия, которым белки осаждаются из кислого раствора (при добавлении нормальной серной кислоты). Раствор вольфрамата должен быть приблизительно нейтральным по фенолфталеину, в противном случае его усредняют.

3. Гваяковой смолы спиртовый раствор готовят, растворяя 0,5 г гваяковой смолы в 50 мл 90%-ного спирта. Раствор хранят в темной склянке. Смолу сохраняют, защищая от действия света.

4. Гипобромита (NaBrO) раствор. Растворяют 300 г едкого натра в 1000 мл воды и постепенно, при хорошем охлаждении, приливают к этому раствору под тягой 50 г брома (уд. веса 3,14). Хранят в темной склянке.

5. Гипохлорита (NaClO) раствор. Смешивают 36 мл 35%-ного раствора едкого натра с 120 г льда и пропускают хлор до привеса 14,5 г. Доводят водой до 200 мл и фильтруют через асбест. Другой способ получения указан в работе 143.

6. Диазотированной сульфаниловой кислоты раствор. 2 г сульфаниловой кислоты смешивают с 3 мл воды и 2 мл концентрированной соляной кислоты и добав-

ляют раствор 1 г нитрита натрия в 2 мл воды до реакции на иодкрахмальную бумагу. Кристаллы диазобензолсульфокислоты отсасывают, промывают и еще влажными растворяют в растворе соды.

Кислый раствор диазотированной сульфаниловой кислоты получают, смешивая непосредственно перед употреблением 10 мл раствора 0,5 г сульфаниловой кислоты и 8 мл соляной кислоты уд. веса 1,12 в 1000 мл воды с 0,2 мл раствора 0,5 г нитрита натрия в 100 мл воды.

7. Дипептидазы раствор. 40 г хорошо измельченной почки собаки настаивают с 80 мл 87%-ного глицерина, подкисленного 0,5 мл 20%-ной уксусной кислоты, в течение 5—10 дней. Глицериновый экстракт осторожно декантируют с осадка и затем разбавляют двойным объемом воды и центрифугируют. На каждые 100 мл раствора добавляют 1 мл 1,0 н. уксусной кислоты и снова центрифугируют для отделения осадка белков. Затем к 100 мл раствора добавляют 5 мл буферного раствора с pH = 3,8 и при охлаждении льдом адсорбируют дипептидазу, добавляя 15 мл гидрата окиси железа (350 мг Fe_2O_3). Жидкость отделяют центрифугированием и адсорбированную дипептидазу элюируют 30 мл 1%-ного раствора вторичного фосфата, содержащего 20% глицерина. Гидрат окиси железа удаляют центрифугированием и, таким образом, получают активный раствор дипептидазы, который сохраняют в холодном шкафу (до 10 дней).

8. Индикатор смешанный для ацидиметрического титрования готовят в небольших количествах и сохраняют в виде отдельных растворов. 0,02%-ный раствор метилрот готовят, растворяя 0,1 г красителя в 300 мл спирта и добавляя затем 200 мл воды. 25 мл такого 0,02%-ного раствора метилрот смешивают с 3 мл 0,1%-ного раствора метиленовой синей. Индикатор дает резкий переход от красного или красно-фиолетового цвета в кислой среде, к зеленому — в щелочной.

Этот же индикатор может быть приготовлен растворением 0,08 г метиленовой синей и 0,12 г метилрот в 100 мл спирта. Через 24 часа индикатор пригоден к употреблению. Он дает резкий переход из фиолетового в кислой среде в зеленый цвет в щелочной среде.

9. Иодкрахмальная бумага. Вымачивают фильтровальную бумагу в смеси 1%-ного раствора крахмала и 5%-ного раствора иодистого калия. Дают стечь жидкости и высушивают. Хранят в темной склянке.

10. Крахмала раствор. Для приготовления 0,25%-ного раствора смешивают 0,25 г растворимого крахмала с небольшим количеством воды, добавляют при перемешивании горячей воды до 100 мл и некоторое время нагревают до полного растворения.

11. Лакмоид. Для приготовления индикатора берут лакмоид, нацело растворимый в горячей воде, спиртовый раствор

которого имеет синий цвет с фиолетовым оттенком. Растворяют 10 г такого лакмоида в 150 мл спирта, раствор фильтруют и прибавляют столько профильтрованного 2%-ного спиртового раствора малахитовой зелени, чтобы при титровании кислоты щелочью не было переходных фиолетовых окрасок. Следует избегать избытка зеленого красителя. Полученную смесь вновь фильтруют.

12. Липоксидазы раствор. 15 г обезжиренной муки бобов сои хорошо встряхивают с 100 мл 0,1 н. ацетатного буфера с pH=4,5. Центрифугируют и прозрачный центрифугат доводят добавлением аммиака до pH=6,7. Добавляют на сто объемов экстракта пять объемов 20%-ного ацетата бария, десять объемов ацетона и два объема 20%-ного основного ацетата свинца. Выпадающий при этом осадок удаляют центрифугированием. Затем на 100 мл прозрачного центрифугата добавляют 25 г кристаллического сернокислого аммония и выпавший снова осадок отделяют, декантируя прозрачную жидкость. К полученному экстракту добавляют еще сернокислого аммония, так чтобы его концентрация достигла 40 г на 100 мл экстракта. При этом выпадает осадок, содержащий липоксидазу. Осадок отделяют центрифугированием, растворяют в небольшом количестве воды и нагревают 5 минут при 63°, причем осаждается сопутствующий липоксидазе неактивный протеин. Его отделяют и получают активный экстракт, содержащий липоксидазу. Такой раствор с добавкой небольшой капли толуола может храниться в течение недели при температуре около 0°.

13. Миллона реактив. Растворяют одну часть ртути в двух частях азотной кислоты уд. веса 1,4 при нагревании на водяной бане. Добавляют два объема воды и немного 1%-ного раствора нитрита натрия.

14. «Нади» реактив. Реактив готовят, смешивая 1%-ный водный раствор N-диметил-*p*-фенилендиамина с 1%-ным раствором *α*-нафтола в спирте и 1,5%-ным раствором соды. Реактив нестоек и готовится перед употреблением.

15. Несслера реактив (основной). Растворяют 50 г иодистого калия в 50 мл воды и добавляют горячего концентрированного раствора сулемы до прекращения растворения образующегося при сливании растворов осадка. Прибавляют затем раствор 150 г едкого калия в 300 мл воды, доводят водой до литра и добавляют еще 5 мл раствора сулемы. Дают отстояться и сливают с осадка прозрачный раствор. Хранят в темной склянке.

16. Несслера реактив (первая модификация) 10 мл HgJ_2 растирают в ступке с 10 мл воды и переносят в склянку темного стекла. Ступку споласкивают 10 мл воды и сливают в ту же склянку. Добавляют 5 г KJ. Затем 20 г едкого калия растворяют в 80 мл воды и этот раствор добавляют к смеси в склянке. После этого оставляют смесь на несколько дней, в течение которых выкристаллизовывается избыток ртутных солей и над осадком отстаивается прозрачная светложелтая жидкость. Ее пере-

ливают в другую темную склянку, которую закрывают корковой пробкой, опущенной предварительно в расплавленный парафин. Реактив хранится в темном месте.

17. Несслера реактив (вторая модификация). Растворяют 15 г KJ и 11 г J в 100 мл воды. Прибавляют 15 г химически чистой металлической ртути и встряхивают до тех пор, пока жидкость не станет светлой (около 10 минут). Затем смесь охлаждают проточной водой и встряхивают, пока жидкость не приобретет зеленоватого оттенка. Жидкость сливают с нерастворившейся ртути в мерную колбу на 200 мл, ртуть промывают водой, которую сливают в ту же колбу. Доводят дестиллированной водой до метки. Из этого основного раствора берут 75 мл и добавляют 75 мл дестиллированной воды и 350 мл 10%-ного раствора NaOH, не содержащего карбонатов. Общий объем 500 мл отстаивают до полной прозрачности.

18. Панкреатин. Поджелудочную железу, по возможности, освобождают от жировой ткани, измельчают, смешивают с пятикратным объемом ацетона и встряхивают около 2 часов. Фильтруют, осадок снова обрабатывают ацетоном, затем ацетоном с эфиром (1 : 1) и, наконец, два раза двойным объемом эфира. Затвердевший осадок высушивают на фильтровальной бумаге, тщательно измельчают в ступке или шаровой мельнице и просеивают через тонкое сито. Получают светлый порошок. Препарат панкреатина при настаивании с чистым или водным глицерином дает прозрачные растворы, содержащие трипсин, липазу и панкреатическую амилазу.

19. Панкреатической железы глицериновый экстракт. Такой экстракт готовят настаиванием или сухого панкреатина, или тонкоизмельченной поджелудочной железы с глицерином, либо с смесью глицерина и воды.

20. Пепсин. Измельченную слизистую оболочку желудка настаивают около суток с десятикратным объемом 0,5%-ной соляной кислоты. Фильтруют через марлю. К прозрачному фильтрату добавляют 15% от его веса хлористого натрия. Выпавший осадок отделяют, снова растворяют в 0,5%-ной соляной кислоте и снова осаждают хлористым натрием. Осадок хорошо отжимают, высушивают на воздухе и измельчают.

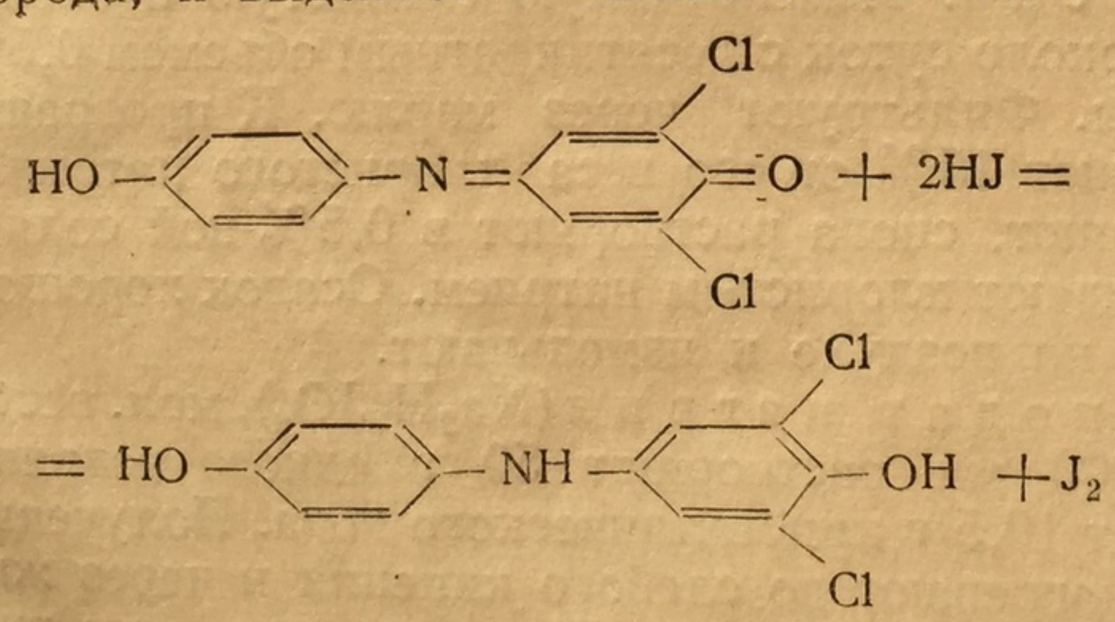
21. Периодат натрия ($Na_2H_3JO_6$), мол. вес 272. В колбе емкостью 1000 мл растворяют 50 г едкого натрия в 500 мл воды и вносят 10,5 г кристаллического иода. Полученный раствор гипоиодита нагревают до слабого кипения и через жидкость под тягой пропускают ток хлора. Жидкость при этом вначале светлеет, затем появляется белая муть от начинающих выпадать кристаллов периодата и, наконец, выпадает обильный кристаллический осадок. Нагревание прекращают и пропускают хлор еще 10 минут. Вся операция обычно занимает 35—40 минут. Теплую жидкость отсасывают через воронку и осадок на фильтре промывают два раза. Для промывки берут всего 100 мл воды. Осадок отжимают,

снимают с фильтра и высушивают при температуре не выше 80°. Получают 20 г кристаллического периодата.

22. Раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола титрованный. 2,6-дихлорфенолиндофенол в водном растворе довольно быстро разрушается и поэтому для приготовления его раствора пользуются фосфатной буферной смесью № 9 с pH=6,9—7,0 (см. приготовление буферных смесей). Затем отвешивают 0,25 г 2,6-дихлорфенолиндофенола, добавляют 700 мл дестиллированной воды и затем 300 мл приготовленной буферной смеси. Раствор хорошо встряхивают, на следующий день отфильтровывают и оставляют еще на два-три часа, время от времени встряхивая. Такой раствор хранится в темной склянке и пригоден к употреблению в течение 20 дней. Раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола должен употребляться всегда свежеприготовленным, так как при хранении он несколько изменяется, что сказывается в замедлении окисления аскорбиновой кислоты и, следовательно, в недостаточно четком определении конца титрования.

Установка титра раствора. Титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола обычно устанавливается по соли Мора. Проще титр может быть установлен титрованием точной навески совершенно чистой аскорбиновой кислоты, не содержащей дегидроаскорбиновой кислоты и других примесей. Наиболее доступными и в то же время точными являются методы иодометрического титрования, исключающие необходимость пользоваться совершенно чистой аскорбиновой кислотой.

а. Метод Стравчинского. В коническую колбу на 50 мл отмеривают 10 мл титруемого 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, прибавляют туда же 0,5 г иодистого калия и 1,0 мл серной кислоты (1 : 4). Встряхивают содержимое колбы, причем окраска красителя исчезает в результате окисления иодистого водорода, и выделяется эквивалентное количество иода:



После этого добавляют несколько капель 1%-ного раствора крахмала и титруют иод 0,01 н. раствором тиосульфата, пользуясь микробюреткой.

$$J_2 + 2Na_2S_2O_3 = 2NaJ + Na_2S_4O_6.$$

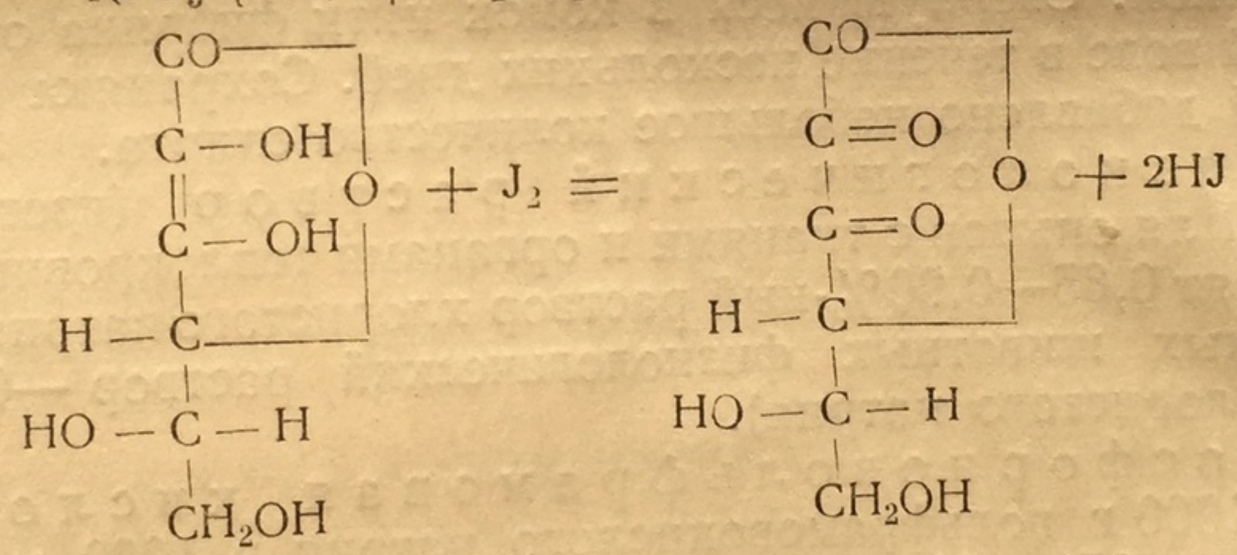
Так как при подобном определении возможна ошибка за счет выделения некоторого количества иода из реактивов, то парал-

лельно ставят слепой опыт, для которого берут те же количества серной кислоты, иодистого калия и раствора крахмала, но вместо раствора красителя — берут 10 мл дестиллированной воды. В случае выделения иода его оттитровывают 0,01 н. тиосульфатом и израсходованный объем вычитают из количества миллилитров тиосульфата, найденных в основном опыте.

Титр 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола целесообразнее всего выражать прямо в мг аскорбиновой кислоты. Для расчета принимают во внимание приведенные выше уравнения окислительно-восстановительных реакций. 1 мл 0,01 н. раствора тиосульфата отвечает 0,88 мг аскорбиновой кислоты. Умножают количество израсходованных миллилитров тиосульфата на 0,88 и, таким образом, определяют количество миллиграммов аскорбиновой кислоты, отвечающей 10 мл 0,001 н. раствора красителя.

б. Метод Прокошева. Растворяют приблизительно 1 г аскорбиновой кислоты в 50 мл 2%-ной серной кислоты. Из этого раствора отбирают 5 мл и титруют из микробюретки 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления неисчезающего розового окрашивания. Затем другие 5 мл того же раствора аскорбиновой кислоты отбирают в колбу, добавляют 0,1 г кристаллического иодистого калия и 5 капель 1%-ного раствора крахмала и титруют из микробюретки точно установленным 0,001 н. раствором KJO_3 до появления синего окрашивания.

$$KJO_3 + 5KJ + 3H_2SO_4 = 3K_2SO_4 + 3H_2O + 3J_2$$



Так как 1 мл 0,001 н. раствора KJO_3 отвечает 0,088 мг аскорбиновой кислоты, то искомый титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола по аскорбиновой кислоте в мг на мл будет: $x = 0{,}088 \times a/в$, если a — израсходованное при первом титровании количество раствора красителя, а $в$ — количество мл раствора 0,001 н. иодата калия.

Раствор 0,001 н. KJO_3 (иодата калия) готовится точным разведением основного 0,01 н. раствора, который получают растворением в 1000 мл воды 0,3568 г KJO_3, высушенного при 102°.

23. Раствор иода в иодистом калии. Растворяют 20 г иодистого калия и 12,7 г иода в 1000 мл воды.

24. Раствор иодной ртути в иодистом калии для осаждения белков. Готовят насыщенный раствор иодной ртути в 5%-ном растворе иодистого калия.

25. Реактив Барфёда. Растворяют в 1000 мл воды 50 г уксуснокислой меди и 50 г уксуснокислого натрия и прибавляют 5 мл ледяной уксусной кислоты.

26. Реактив висмутовый. Растворяют 4 г сегнетовой соли и 2 г основного азотнокислого висмута в 100 мл 10%-ного едкого натра.

27. Уксуснокислой ртути раствор. В склянке с притертой пробкой смешивают 11 г желтой окиси ртути с 40 мл дестиллированной воды (без углекислоты) и 6 г ледяной уксусной кислоты, тщательно взбалтывают и оставляют стоять на 10 дней, время от времени встряхивая. Раствор фильтруют и на каждые 10 мл фильтрата добавляют 2 мл дестиллированной воды. Полученный 25%-ный раствор сохраняют в темной склянке.

28. Ураниловый реактив. Растворяют 500 г серно-кислого аммония в 600 мл воды и, отдельно, 5 г уксуснокислого уранила в 100 мл воды. Оба раствора смешивают, добавляют 6 мл ледяной уксусной кислоты и воды до 1000 мл.

29. Фелинга реактив. (I) 69,28 г $CuSO_4 . 5H_2O$ растворяют в 1000 мл воды. (II) 346 г сегнетовой соли ($C_4H_4O_6KNa . 4H_2O$) и 140 г едкого натра растворяют в 1000 мл воды. Непосредственно перед употреблением смешивают равные объемы (I) и (II) растворов.

30. Фибрин. Кровь дефибринируют, непрерывно помешивая палочкой. Свернувшиеся в комок нити фибрина отмывают в проточной воде в течение нескольких дней. Сохраняют под водой, к которой добавлено небольшое количество спирта.

31. Физиологический раствор (изотонический раствор). Для опытов с тканями и органами теплокровных животных готовят 0,85—0,90%-ный раствор хлористого натрия (для пойкилотермных животных физиологический раствор —0,65%-ный раствор хлористого натрия).

32. Фосфорновольфрамовая кислота. Растворяют 1000 г вольфрамовокислого натрия в 1000 мл горячей воды, вносят 250 г Na_3PO_4 и нагревают до полного растворения. К еще теплому раствору добавляют около 500 мл 30%-ной серной кислоты до слабокислой реакции. Выпаривают раствор до появления кристаллической пленки Na_2SO_4 и через 10—20 часов декантируют с кристаллов сиропообразный раствор, сливая его в делительную воронку емкостью 1000 мл. К полученному сиропообразному раствору добавляют два объема эфира и постепенно при перемешивании 70%-ную серную кислоту. Образуются три слоя. Нижний маслообразный слой отделяют и снова добавляют в делительную воронку серную кислоту до нового выделения маслообразного слоя. Последний снова отделяют, присоединяя к первой части, и все растворяют в воде. Снова извлекают эфиром

и отделяют от воды. Эфир удаляют испарением. Добавляют несколько капель брома для обесцвечивания. Выкристаллизовывается фосфорновольфрамовая кислота, которую отделяют от небольшого количества маточного раствора.

33. Фосфорномолибденовая кислота. Растворяют 150 г молибденовокислого аммония в 1000 мл воды и добавляют 1000 мл азотной кислоты уд. веса 1,2. К полученному раствору, при нагревании на водяной бане, добавляют Na_2HPO_4, до прекращения образования осадка. Выпавшую соль отсасывают, промывают водой и растворяют в растворе соды. Выпаривают досуха, слабо прокаливают, растворяют в 10 частях подкисленной азотной кислотой воды, фильтруют; фильтрат подкисляют азотной кислотой до кислой реакции и извлекают эфиром. Нижний маслянистый слой отделяют, удаляют эфир испарением и перекристаллизовывают фосфорномолибденовую кислоту из воды с добавлением нескольких капель бромной воды.

34. Фосфорномолибденовая кислота для осаждения белков. Растворяют 5 г фосфорномолибденовокислого натрия и 5 г безводного сернокислого натрия в 75 мл воды, прибавляют 8—10 капель 30%-ного едкого натра и кипятят 20 минут. Переносят в мерную колбу на 1000 мл, добавляют 15 мл концентрированной серной кислоты и 0,25 г глюкозы и доливают водой до метки. Раствор хранят в закрытой склянке с сифоном.

35. Энтерокиназы препарат. Соскабливают слизистую оболочку тонких кишок и растирают в ступке с песком. Образуется густое тесто, которое высушивают в тонком слое в эксикаторе над серной кислотой. 10 г сухой массы извлекают 50 мл 0,9%-ного раствора хлористого натрия и фильтруют раствор через стеклянную вату.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОБЩАЯ ЧАСТЬ

Глава I

ЭЛЕМЕНТАРНЫЙ И ОБЩИЙ ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ОРГАНИЗМА

Работа 1. Определение содержания воды и сухого остатка в крови . . . 9
Работа 2. Определение содержания воды и сухого остатка в мышечной ткани 9
Работа 3. Качественное открытие важнейших элементов, входящих в состав ткани 9
Работа 4. Качественное исследование состава кости 12
Работа 5. Качественное открытие иода в ткани щитовидной железы . . 12
Работа 6. Качественное открытие роданистых солей в слюне человека . . 13
Работа 7. Определение кальция в мышечной ткани по Ретинскому . . . 13
Работа 8. Определение кальция и магния в сыворотке крови 14
Работа 9. Определение неорганического, органического и общего фосфора в сыворотке крови 17
Работа 10. Определение хлора в мышечной ткани или крови 19
Работа 11. Определение хлора в крови по Рушняку 19
Работа 12. Определение общего азота мышечной ткани или крови по Кьельдалю 20

Глава II

АКТИВНАЯ РЕАКЦИЯ СРЕДЫ И БУФЕРНЫЕ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМА

Работа 13. Колориметрическое определение концентрации водородных ионов безбуферным методом 26
Работа 14. Колориметрическое определение концентрации водородных ионов окрашенной жидкости 28
Работа 15. Приготовление и изучение свойств буферных смесей 29
Работа 16. Колориметрическое определение концентрации водородных ионов с помощью буферных смесей 30
Работа 17. Определение угольной кислоты, связанной в виде бикарбоната в плазме крови 31

Глава III

ФЕРМЕНТЫ

Общая характеристика ферментативных реакций

Работа 18. Специфичность ферментативного действия 40
Работа 19. Термолабильность ферментов и влияние [H·] на ферментативные реакции 40
Работа 20. Влияние температуры на скорость ферментативной реакции . 41
Работа 21. Зависимость скорости ферментативной реакции от количества фермента 41
Работа 22. Определение [H·] оптимальной для амилокластической активности амилазы слюны 42
Работа 23. Влияние хлористого натрия и фенилтиомочевины (активаторов) на амилокластическую активность амилазы слюны 43

Отдельные представители ферментов и получение ферментных препаратов

Работа 24. Получение препарата сахаразы из дрожжей 45
Работа 25. Получение препарата, содержащего панкреатическую амилазу 46
Работа 26. Гидролитическое расщепление жира при действии панкреатической липазы 47
Работа 27. Кинетика гидролитического расщепления жира под действием липазы 47
Работа 28. Получение препарата уреазы из бобов сои 48
Работа 29. Получение препарата пепсина 49
Работа 30. Трипсин и триптический гидролиз белка 50
Работа 31. Коагулирующее действие химозина и других протеаз 51
Работа 32. Свертывание крови — действие тромбина (фибрин-фермента) 52
Работа 33. Сукциндегидраза мышц 54
Работа 34. Цитохромоксидаза (индофенолоксидаза) 57
Работа 35. Альдегидраза (ксантиноксидаза) молока 59
Работа 36. Фенолоксидазы 61
Работа 37. Пероксидазы 64
Работа 38. Каталаза 66

Количественные определения ферментативного действия и активности ферментов

Работа 39. Определение амилокластической активности амилазы слюны . 69
Работа 40. Определение активности химозина 71
Работа 41. Определение активности тромбина (фибрин-фермента) 72
Работа 42. Определение активности пепсина по Метту 72
Работа 43. Определение активности каталазы по Баху и Зубковой . . . 73

Глава IV

УГЛЕВОДЫ

Работа 44. *d*-(+)-Глюкоза 76
Работа 45. Восстановительная способность глюкозы (реакции восстановления) 78
Работа 46. Определение угла вращения плоскости поляризации и удельного вращения *d*-глюкозы 80
Работа 47. Наблюдение мутаротации с раствором *d*-глюкозы 82
Работа 48. Определение глюкозы по Фелингу 82
Работа 49. Определение глюкозы по Бертрану 83
Работа 50. Определение глюкозы с гипоиодитом 85
Работа 51. *d*-(—)-Фруктоза (левулоза) 88
Работа 52. Реакция Селиванова 88
Работа 53. Цветная реакция с ванилином 89
Работа 54. Мальтоза и лактоза 89
Работа 55. Качественный анализ смеси углеводов методом распределительной хроматографии на фильтровальной бумаге 90
Работа 56. Зависимость редуцирующей способности сахаров от реакции среды и строения молекулы сахара 92
Работа 57. Сахароза 93

Полисахариды

Работа 58. Получение крахмала и растворимый крахмал 95
Работа 59. Реакция крахмала с иодом 95
Работа 60. Промежуточные ступени гидролиза крахмала 96
Работа 61. Гидролиз целлюлозы (клетчатки) 97
Работа 62. Получение гликогена 97

Энзиматический гидролиз углеводов

Работа 63. Определение амилокластической активности (декстринирующего действия) панкреатической амилазы 99
Работа 64. Определение осахаривающего действия панкреатической амилазы 99

Обмен углеводов

Работа 65. Определение сахара крови по Хагедорн-Иенсену 104
Работа 66. Изменение содержания сахара в крови при повышенном всасывании глюкозы в кишечнике 106
Работа 67. Открытие сахара в моче 107
Работа 68. Определение гликогена в печени 109
Работа 69. Определение молочной кислоты в крови 109

Глава V

ЛИПОИДЫ

Жиры

Работа 70. Качественное исследование жира 116
Работа 71. Щелочное омыление жира и получение жирных кислот . . . 117
Работа 72. Определение температуры плавления жира 118
Работа 73. Определение коэфициента преломления жира с рефрактометром Аббе 118
Работа 74. Определение кислотного числа жира 120
Работа 75. Определение числа омыления и эфирного числа жира 120
Работа 76. Определение иодного числа жира 121

Прогоркание жиров

Работа 77. Открытие перекисей в прогоркающем жире 123
Работа 78. Количественное определение перекисей в жире (определение активного кислорода) 124
Работа 79. Открытие эпигидринового альдегида 124
Работа 80. Открытие альдегидов в прогорклом жире 125
Работа 81. Липоксидаза 125
Работа 82. Определение активности липоксидазы 126

Обмен жиров

Работа 83. Открытие ацетоновых тел в моче 130
Работа 84. Количественное определение ацетона в моче 132

Стероиды

Работа 85. Получение холестерина из мозга 136
Работа 86. Цветные реакции на холестерин 136
Работа 87. Открытие холестерина в составе желчи 137
Работа 88. Определение холестерина в крови или сыворотке 137
Работа 89. Свойства и реакции желчных кислот 138

Фосфатиды (фосфолипиды)

Работа 90. Выделение и исследование фосфатидов 142

Глава VI
БЕЛКИ (ПРОТЕИНЫ)

Реакции осаждения

Работа 91. Осаждение при нагревании кислотами и солями тяжелых металлов 150
Работа 92. Осаждение алкалоидными реактивами 150
Работа 93. Осаждение гидратами окисей цинка и меди и каолином . . . 151
Работа 94. Осаждение алкоголем и нейтральными солями щелочных и щелочноземельных металлов (высаливание) 151

Изоэлектрический пункт

Работа 95. Определение изоэлектрического пункта белков методом коагуляции 153

Цветные реакции

Работа 96. Биуретовая реакция (реакция Пиотровского) 154
Работа 97. Нингидриновая реакция. 156
Работа 98. Ксантопротеиновая реакция (реакция на тирозин, триптофан, фенилаланин) 157
Работа 99. Реакция на тирозин (реакция Миллона) 158
Работа 100. Реакция на тирозин с нитрозо-β-нафтолом 158
Работа 101. Реакция на триптофан (реакция конденсации с альдегидами) 159
Работа 102. Реакция с диазобензолсульфокислотой (реакция на тирозин и гистидин) 160
Работа 103. Реакция с бромом на гистидин 161
Работа 104. Реакция на серусодержащие аминокислоты 161
Работа 105. Реакция на метионин 162
Работа 106. Реакция на аргинин 162
Работа 107. Реакция на гликоколл (глицин) 163
Работа 108. Реакция Подобедова 163

Методы количественного исследования аминокислот, полипептидов и белков

Работа 109. Выделение аргинина из белковых гидролизатов 164
Работа 110. Колориметрическое определение триптофана 165
Работа 111. Колориметрическое определение фенилаланина 165
Работа 112. Колориметрическое определение тирозина 166
Работа 113. Формольное титрование 167
Работа 114. Титрование карбоксильных групп аминокислот, полипептидов и белков в водно-алкогольном растворе 168
Работа 115. Газометрическое определение свободных аминогрупп по Ван-Слайку 169

Отдельные представители белковых веществ

Работа 116. Яичный альбумин (овальбумин) 177
Работа 117. Сывороточный альбумин (серумальбумин) 178
Работа 118. Миозин (мышечный глобулин) 179
Работа 119. Коллаген 180
Работа 120. Казеин 180
Работа 121. Нуклеопротеид дрожжей 181
Работа 122. Гемоглобин 184

Продукты гидролитического расщепления белков и ферментативный гидролиз белков и полипептидов

Работа 123. Кислотные и щелочные альбуминаты 194
Работа 124. Альбумозы и пептоны 195
Работа 125. Продукты пептического гидролиза белков 196
Работа 126. Продукты триптического гидролиза белков 196

Работа 127. Действие комплекса ферментов эрепсина 197
Работа 128. Определение активности пептического действия 197
Работа 129. Определение пептической активности по расщеплению глобина крови 198
Работа 130. Определение пептической активности по расщеплению белков сыворотки крови 198
Работа 131. Определение триптического действия с помощью формольного титрования 199
Работа 132. Определение активности триптического действия 200
Работа 133. Действие дипептидазы слизистой тонких кишок или ткани почек 200

Исследование различных фракций азотистых веществ тканей

Работа 134. Определение общего азота сыворотки крови 204
Работа 135. Определение белкового азота и белка сыворотки крови . . 205
Работа 136. Рефрактометрическое определение белков сыворотки крови 206
Работа 137. Определение небелкового (остаточного) азота в сыворотке крови по Культюгину 207
Работа 138. Определение небелкового (остаточного) азота в сыворотке крови по Энгельгардту и Любимовой 209
Работа 139. Определение азота мочевины в крови уреазным методом . . . 210

Обмен белков и конечные продукты азотистого обмена

Работа 140. Определение общего азота мочи по Кьельдалю 220
Работа 141. Определение общего азота мочи по Иохельсону 220
Работа 142. Получение мочевины из мочи. 221
Работа 143. Количественное определение мочевины в моче по Бородину . 222
Работа 144. Количественное определение азота аммиака в моче 223
Работа 145. Колориметрическое определение азота аммиака в моче по Сергееву 225
Работа 146. Открытие креатинина в моче 225
Работа 147. Количественное определение креатинина в моче 227
Работа 148. Количественное определение креатина в моче 228
Работа 149. Качественное открытие мочевой кислоты в моче 228
Работа 150. Исследование некоторых свойств мочевой кислоты . . . 229
Работа 151. Осаждение мочевой кислоты в виде кислого мочекислого аммония 230
Работа 152. Определение мочевой кислоты в моче 230
Работа 153. Определение гиппуровой кислоты в моче 231
Работа 154. Открытие индикана в моче 232

Глава VII

ВИТАМИНЫ

Группа витамина А

Работа 155. Цветные реакции на витамин А 237
Работа 156. Определение суммы каротиноидов в сыворотке крови по Рачевскому 237

Группа витамина D

Работа 157. Цветные реакции на витамин D 239

Группа витамина Е

Работа 158. Открытие витамина Е 241
Работа 159. Количественное определение витамина Е по Захаровой и Девятнину 241

Группа витамина К

Работа 160. Цветные реакции на витамин К 243

Витамин С (*l*-аскорбиновая кислота)

Работа 161. Качественное открытие витамина С 246
Работа 162. Количественное определение аскорбиновой кислоты 246

СПЕЦИАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава VIII

ХИМИЯ МЯСА

Работа 163. Качественное исследование химического состава мышцы . . 255
Работа 164. Определение общего, белкового и остаточного азота и азота белков, извлекаемых водой 257
Работа 165. Определение различных фракций белкового азота мяса по Миндлиной и Пальмину 259
Работа 166. Определение коллагена и эластина в мясе по Воловинской . 2 0
Работа 167. Определение миозина (актомиозина) по Соловьеву 262
Работа 168 Получение миозина 262
Работа 169. Определение изоэлектрического пункта цельной мышцы и ее водного экстракта 263
Работа 170. Фракционирование белков водного экстракта мышцы . . . 264
Работа 171. Определение карнозина по Паршину 265
Работа 172. Определение азота аммиака (азота аммонийных солей) в мышце 265
Работа 173. Определение гликогена в мышце 266
Работа 174. Определение гликогена и редуцирующего сахара по Воловинской и Широкову 267
Работа 175. Определение общего и неорганического фосфора в мясе по Ширскову 269
Работа 176. Определение аскорбиновой кислоты в мясе 273
Работа 177. Определение жира в мясе 273
Работа 178. Определение иодного числа жира 273
Работа 179. Определение кислотности жира и проба на появление кислотности с нейтральной красной 274
Работа 180. Качественное определение перекисей в жире по Кульбергу и Сойферу 275
Работа 181. Наблюдение над окислением жира при действии липоксидазы 275

Приготовление некоторых реактивов и препаратов 277

Редактор *П. И. Дикарев*
Технич. редактор *Е. И. Кисина*

Л117762. Сдано в набор 8/VIII 1950 г.
Подписано к печати 9/X 1950 г.
Формат 60×92/16. Объем 18¼ п. л.
Уч.-изд. л. 20,18. Тираж 5 000.
Цена 11 руб. Заказ 1798.

Первая Образцовая типография имени А. А. Жданова Главполиграфиздата при Совете Министров СССР. Москва, Валовая, 28.

19

ГУГ ГОД ЛЕНИНОВСКИЙ ДОМ КНИГИ
ПРАКТИЧЕСКОЕ РУК-ВО
БИОХИМИИ МЯСА КОРИЧ
ДРОЗДОВ
Цена 1300 РУБ
682294

ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО ПО БИОХИМИИ МЯСА